

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
der Freien Universität Berlin  
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Heinz Tiedemann

---

Reinigung und Charakterisierung  
der vier lysinspezifischen  
Transfer-Ribonucleinsäuren  
aus Hühnerembryonen

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Burghardt Wittig  
aus Celle

1976





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41549013\\_0011](https://archive.org/details/IA41549013_0011)



**Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
der Freien Universität Berlin  
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Heinz Tiedemann**

---

**Reinigung und Charakterisierung  
der vier lysinspezifischen  
Transfer-Ribonucleinsäuren  
aus Hühnerembryonen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Burghardt Wittig  
aus Celle**

**Referent: Prof.Dr.rer.nat. Dr.med. Heinz Tiedemann**

**Korreferent: Prof.Dr.rer.nat. H.-G. Wittmann**



**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche  
der Freien Universität Berlin**

**Promoviert am: 13.5.1976**

Die Arbeitsgruppe Assistenzprofessor Dr. H. Gottschling war der Rahmen für die Experimente zu unseren Dissertationen. Wir danken Hubert Gottschling, daß er uns lehrte zu malen, das Bild uns aber selber malen ließ. Auf diese Weise wurde ein Freiraum für Denken, Experimente und Kritik erhalten, der Naturwissenschaften möglich macht.

Burghardt Wittig  
Stephanie Reuter



## Abkürzungen:

|                                              |                                                                                                  |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Styrolcopolymer                              | Polystyrol-(2% Divinylbenzol)-<br>Copolymer (Merrifield-Harz)                                    |
| Carbobenzoxy-L-glutamat                      | durch die Benzyloxycarbonyl-Gruppe N-geschütztes L-Glutamat                                      |
| Cbz                                          | in Schemata und Tabellen gebraucht für Benzyloxycarbonyl-                                        |
| Et <sub>3</sub> N                            | in Schemata gebraucht für Triäthylamin                                                           |
| PPO                                          | 2,5-Diphenyloxazol                                                                               |
| POPOP                                        | 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol                                                     |
| TCA                                          | Trichloressigsäure                                                                               |
| EDTA                                         | Äthylendiamintetraessigsäure                                                                     |
| ( <sup>14</sup> C-)Lysin                     | in Verbindungen gebraucht für <sup>14</sup> C-markiertes L-Lysin                                 |
| Poly(A)                                      | Polyadenylsäure                                                                                  |
| tRNS                                         | Transfer-Ribonucleinsäure                                                                        |
| tRNS <sup>Lys</sup>                          | lysinspezifische Transfer-Ribonucleinsäure                                                       |
| ( <sup>14</sup> C-)Lysyl-tRNS <sup>Lys</sup> | mit <sup>14</sup> C-markiertem L-Lysin aminoacylierte lysinspezifische Transfer-Ribonucleinsäure |
| RPC-5                                        | Reversed-Phase-5-Chromatographie                                                                 |

DEAE-Sephadex

Diäthylaminoäthyl-Sephadex

BD-Cellulose

Benzoylierte DEAE-Cellulose

Definitionen:

1  $E_{260nm}$ -Einheit ist die Menge  
RNS, die, gelöst in 1 ml 10 mM  
 $MgCl_2$ , 10 mM Tris-HCl, pH 7,0,  
eine Extinktion von 1 bei 260 nm  
und 1 cm Lichtweg ergibt.

1 mg RNS entspricht 22  $E_{260nm}$ -  
Einheiten.

Enzyme:

Polynucleotid-Phosphorylase  
(PNPase) (EC 2.7.7.8)

Ribonuclease- $T_1$  (RNase- $T_1$ ) oder  
Ribonucleat-guaninnucleotid-2'-  
Transferase (zyklisierend)  
(EC 2.7.7.26)

Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)

L-Aminosäure:trNS-Ligase(AMP)  
(EC 6.1.1)

| Inhaltsverzeichnis                                                                                                                            | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                                                                                 | 1     |
| 2. Experimenteller Teil                                                                                                                       | 8     |
| 2.1 Material                                                                                                                                  | 8     |
| 2.2 Methoden                                                                                                                                  | 10    |
| 2.2.1 Versuche zur Reinigung von tRNS <sup>Lys</sup> durch<br>Kopplung von ( <sup>14</sup> C-)Lysyl-tRNS <sup>Lys</sup> an<br>Merrifield-Harz | 10    |
| 2.2.1.1 Herstellung des Carbobenzoxy-L-glutamat-<br>esters von N-Hydroxysuccinimid                                                            | 10    |
| 2.2.1.2 Synthese von Carbobenzoxy-L-glutamyl-<br>( <sup>14</sup> C-)L-lysin                                                                   | 10    |
| 2.2.1.3 Anfärbung der Dünnschichtchromatogra-<br>phieplatten                                                                                  | 11    |
| 2.2.1.4 Veresterung von Carbobenzoxy-L-glutamat<br>an chlormethyliertem Styrolcopolymer                                                       | 12    |
| 2.2.1.5 Hydrolyse des Carbobenzoxyglutamyl-<br>Styrolcopolymers und Bestimmung des<br>freigesetzten Glutamats                                 | 12    |
| 2.2.1.6 Herstellung des N-Hydroxysuccinimidesters<br>von Carbobenzoxy-L-glutamyl-Styrol-<br>copolymer                                         | 13    |
| 2.2.1.7 Synthese von ( <sup>14</sup> C-)Lysyl-carbobenzoxy-<br>glutamyl-Styrolcopolymer                                                       | 14    |

|                                                                                                                                                                                                      | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.2.1.8 Kopplung von ( $^{14}\text{C}$ -)lysyl-tRNS <sup>Lys</sup> an<br>Carbobenzoxylglutamyl-Styrolcopolymer                                                                                       | 15    |
| 2.2.1.9 Abspaltung von tRNS <sup>Lys</sup> von ( $^{14}\text{C}$ -)lysyl-<br>tRNS <sup>Lys</sup> -carbobenzoxylglutamyl-Styrolco-<br>polymer                                                         | 16    |
| 2.2.2 Reinigung von tRNS <sup>Lys</sup> durch Derivati-<br>sierung von ( $^{14}\text{C}$ -)lysyl-tRNS <sup>Lys</sup> , Chro-<br>matographie an BD-Cellulose und Reversed-<br>Phase-5-Chromatographie | 16    |
| 2.2.2.1 Isolierung von tRNS und Präparation einer<br>für L-lysin:tRNS-Ligase(AMP) angereicher-<br>ten Fraktion                                                                                       | 16    |
| 2.2.2.2 Aminoacylierung von tRNS <sup>Lys</sup>                                                                                                                                                      | 17    |
| 2.2.2.3 Herstellung des 2-Naphthoxyacetylesters<br>von N-Hydroxysuccinimid                                                                                                                           | 19    |
| 2.2.2.4 Synthese von 2-Naphthoxyacetyl-lysyl-<br>tRNS <sup>Lys</sup>                                                                                                                                 | 19    |
| 2.2.2.5 Chromatographie an BD-Cellulose                                                                                                                                                              | 21    |
| 2.2.2.6 Hydrolyse der Aminoacyl-Esterbindung von<br>2-Naphthoxyacetyl-( $^{14}\text{C}$ -)lysyl-tRNS <sup>Lys</sup>                                                                                  | 21    |
| 2.2.2.7 Wiederholung des Reinigungsverfahrens<br>an tRNS <sup>Lys</sup> <sub>III</sub> und tRNS <sup>Lys</sup> <sub>IV</sub>                                                                         | 22    |
| 2.2.2.8 Reversed-Phase-5-Chromatographie                                                                                                                                                             | 22    |
| 2.2.3 Charakterisierung der vier tRNS <sup>Lys</sup> -<br>Species                                                                                                                                    | 23    |

|           | Seite                                                                                                                                  |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.3.1   | Spaltung der vier tRNS <sup>Lys</sup> -Species<br>mit RNase-T <sub>1</sub> und Polyacrylamidgel-<br>Elektrophorese der Oligonucleotide | 23 |
| 2.2.3.2   | Synthese der Oligonucleotide ApApGpA<br>und ApApApA                                                                                    | 24 |
| 2.2.3.2.1 | Synthese von ApApGpA                                                                                                                   | 24 |
| 2.2.3.2.2 | Synthese von ApApApA                                                                                                                   | 26 |
| 2.2.3.3   | Gleichgewichtsdialyse                                                                                                                  | 27 |
| 2.2.3.4   | Poly(A)-gesteuerte Polylysinsynthese                                                                                                   | 28 |
| 2.2.3.5   | Bestimmung der Halbwertszeiten der<br>Aminoacyl-Esterbindung                                                                           | 28 |
| 2.2.3.6   | Bestimmung der Sedimentationskoeffi-<br>zienten und Berechnung der Molekular-<br>gewichte                                              | 29 |
| 2.2.3.7   | Analyse der temperaturabhängigen<br>Extinktionstransition                                                                              | 32 |
| 3.        | Ergebnisse                                                                                                                             | 33 |
| 3.1       | Ergebnisse der Versuche zur Kopplung<br>von ( <sup>14</sup> C-)lysyl-tRNS <sup>Lys</sup> an Merrifield-<br>Harz                        | 33 |
| 3.2       | Ergebnisse der Versuche zur Reinigung<br>von tRNS <sup>Lys</sup> durch Derivatisierung von<br>Lysyl-tRNS <sup>Lys</sup>                | 40 |
| 3.3       | Ergebnisse der Versuche zur Reinigung<br>lysinspezifischer tRNS-Einzelspecies                                                          | 49 |

|       | Seite                                                                                                 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.4   | Ergebnisse der Versuche zur Charakterisierung der vier gereinigten tRNS <sup>Lys</sup> -Einzelspecies |
|       | 53                                                                                                    |
| 3.4.1 | Spaltung mit RNase-T <sub>1</sub>                                                                     |
|       | 53                                                                                                    |
| 3.4.2 | Gleichgewichtsdialyse gegen Lysin-Codons enthaltende Tetranucleotide                                  |
|       | 56                                                                                                    |
| 3.4.3 | Poly(A)-gesteuerte Polylysinsynthese                                                                  |
|       | 57                                                                                                    |
| 3.4.4 | Hydrolysekinetik der Lysyl-tRNS <sup>Lys</sup> -Esterbindungen                                        |
|       | 59                                                                                                    |
| 3.4.5 | Sedimentationskoeffizienten und Molekulargewichte                                                     |
|       | 60                                                                                                    |
| 3.4.6 | Temperaturabhängige Extinktionstransition                                                             |
|       | 63                                                                                                    |
| 4.    | Diskussion                                                                                            |
|       | 67                                                                                                    |
| 5.    | Zusammenfassung                                                                                       |
|       | 78                                                                                                    |
| 6.    | Literaturverzeichnis                                                                                  |
|       | 81                                                                                                    |

## 1. Einleitung

"Each amino acid would combine chemically, at a special enzyme, with a small molecule which, having a specific hydrogen-bonding surface, would combine specifically with the nucleic acid template. This combination would also supply the energy necessary for polymerisation. In its simplest form there would be 20 different kinds of adaptor molecules, one for each amino acid, and 20 different enzymes to join the amino acid to their adaptors" (CRICK, 1955) (1).

Lange bevor das DNS-Kryptogramm aus  $4^3$  Basen-Triplets gelesen werden konnte und bevor die biochemische Dechiffrierung der DNS-Strukturgene in den Aminosäuresequenz-Klartext durch Transkription und Translation verstanden wurde, formulierte CRICK diese Adaptor-Hypothese. Er erkannte, daß weder DNS noch RNS physikochemische Eigenschaften haben, die einer Funktion als direkte Matrize für Aminosäuren gerecht werden könnten. Es fehlen spezifisch geformte hydrophobe Oberflächen, an denen Valin von Leucin oder Isoleucin unterschieden werden könnte, und es ist kein Muster von geladenen Gruppen vorhanden, durch das basische und saure Aminosäuren erkannt werden könnten. Ein Informationsfluß zwischen Nucleinsäuren und Proteinen, "von einem Polymer mit einem definierten Alphabet zum anderen" (CRICK, 1970) (2), erfordert deshalb die Adaptation beider Systeme. Die Arbeiten von EIGEN (3) über die Selbstorganisation der biologischen Materie geben eine Vorstellung davon, wie sich ohne physikochemischen Zusammenhang allein durch einen statistischen Vorteil die Zu-

ordnung einer bestimmten Aminosäure zu einem bestimmten Basen-Triplet ausdrücken konnte. Aus der Existenz zweier Systeme, Nucleinsäuren und Proteine, die unabhängig voneinander die gleiche Information tragen, ergibt sich die Bedeutung der Transfer-Ribonucleinsäuren (und der aminoacylierenden Enzyme) als einziger Schlüssel zwischen Nucleinsäure-Chiffre und Aminosäuresequenz-Klartext.

Über die Rolle von tRNS bei der Proteinbiosynthese kann heute zumindest in Prokaryonten ein detailliertes Bild gezeichnet werden (4). Die Biosynthese einiger tRNS-Species ist bekannt (5), viele Basensequenzen wurden aufgeklärt (6) und für kristalline phenylalaninspezifische tRNS aus Hefe wurde aus Röntgenstrahlenbeugungsspektren sogar die dreidimensionale Struktur ermittelt (7,8). Obwohl über die Beziehung zwischen Struktur und Funktion in tRNS-Molekülen viele Einzelergebnisse veröffentlicht wurden (als Übersicht 9-14), rechtfertigt dieser Bestand an Daten eine Interpretation über die Ebene von Hypothesen hinaus nicht. Dies gilt außer für die Mechanismen der spezifischen Aminoacylierung von tRNS und hinsichtlich der Bedeutung der Multiplizität isoakzeptierender tRNS-Arten für diese Aminoacylierung besonders für die selektive Erkennung von tRNS-Einzelspecies innerhalb ihres durch Ribosomen und lösliche Proteinfaktoren katalysierten Reaktionszyklus. Die Gesamtzahl der in vivo existie-

renden tRNS-Einzelspecies ist bisher noch für keinen Organismus bekannt; die Aussagen älterer Arbeiten zu dieser Thematik (15) muß nach der Entwicklung höher auflösender tRNS-Fraktionierungsverfahren angezweifelt werden (16). Besonders in Geweben von höheren Eukaryonten sind von einigen Autoren für einzelne Aminosäuren mehr isoakzeptierende tRNS-Arten nachgewiesen worden, als die Degeneriertheit des genetischen Code es erfordern würde (16,17,18). Es gibt sichere Hinweise dafür, daß das Muster der isoakzeptierenden tRNS-Arten eine bestimmte Regulationssituation in Prokaryonten repräsentiert und in höheren Eukaryonten an bestimmte Funktionen des Organismus angepaßt ist. So werden nach der Infektion des Bakteriums *Escherichia coli* durch den Bakteriophagen T<sub>4</sub> acht neue tRNS-Arten synthetisiert (19), während eine leucinspezifische tRNS-Art der Wirtszelle durch einen definierten Bruch der Polynucleotidkette inaktiviert wird (20). In *Salmonella typhi murium* ist Histidyl-tRNS für die Regulation des Histidin-Operons verantwortlich und übt damit die Transkriptionskontrolle über neun Strukturgene aus (21,22). Die Aktivität des Enzyms Tryptophan-Pyrrolase wird in einer Mutante von *Drosophila melanogaster* durch eine tyrosinspezifische tRNS-Species inhibiert (23), nach Virusinfektion von Mammalier-Zellen treten neue tRNS-Arten auf (24), durch die Behandlung mit Östrogen wird in Hühnerleber die Synthese von zwei

serinspezifischen tRNS-Einzelspecies erhöht (25), für die Synthese des Seidenproteins Fibroin während der Verpuppung der Seidenraupe *Bombyx mori* wird nur eine der isoakzeptierenden tRNS-Arten für Glycin verwendet (26), und in den kollagenreichen Granulationsgeweben heilender Wunden wird mehr prolinspezifische tRNS gefunden als in anderen Geweben (27). Schließlich sollten hier die Ergebnisse von WATERS et al. (28) erwähnt werden, daß tryptophanspezifische tRNS in Hühnerembryonen-Zellen, die mit dem Vogelmyeloblastose-Virus infiziert sind, als Hybridmolekül mit der 35 S-RNS des Virus vorliegt. Diese Hybridmoleküle dienen als Starter für die reverse Transkription.

Welche Methodik zur Reindarstellung von tRNS-Einzelspecies angewendet wird, hängt vorwiegend davon ab, ob nur eine von den jeweiligen für eine Aminosäure spezifischen Species gereinigt werden soll oder ob alle isoakzeptierenden tRNS-Species einer Aminosäurespezifität zu gewinnen sind. Im ersten Fall genügt es, ein unter Umständen nur geringfügig unterschiedliches individuelles Verhalten dieser einen Species in einem Chromatographiesystem oder bei Extraktionsverfahren dadurch hinreichend auszunutzen, daß ein Reinigungsschritt mehrmals wiederholt oder verschiedene Methoden kombiniert werden. Warum tRNS-Species, die einem Anreicherungsverfahren unter-

worfen sind, ein bestimmtes Verhalten zeigen, läßt sich häufig nicht im einzelnen erklären; es ist aber anzunehmen, daß dabei oft kleinste Unterschiede in der Tertiärstruktur von Bedeutung sind. So wandert eine alaninspezifische tRNS aus Hefe in einem Gegenstromverteilungssystem langsamer als tRNS-Species für Tyrosin oder Serin, die besser in der organischen Phase löslich sind, obwohl alle drei tRNS-Arten in Bezug auf die Länge ihrer Polynucleotidketten und ihre Basenzusammensetzung sehr ähnlich sind (29,30,31). Gegenstromverteilungssysteme sind zwar für die Fraktionierung großer tRNS-Mengen gut geeignet, jedoch sind heutige moderne Säulenchromatographieverfahren in ihrer Trennleistung weit überlegen. Durch einmalige Chromatographie von Gesamt-tRNS aus Hühnerembryonen an DEAE-Sephadex A 50 läßt sich eine lysinspezifische tRNS, die länger als andere tRNS auf der Säule zurückgehalten wird, hoch anreichern (H.GOTT-SCHLING, persönliche Mitteilung). Ähnliches gilt für eine methioninspezifische tRNS aus E. coli und aus Hefe, die bei Chromatographie an BD-Cellulose früher als die Hauptmenge der übrigen tRNS eluiert wird (32). Eine Sonderstellung nimmt phenylalaninspezifische tRNS aus dem Cytoplasma von Eukaryonten ein. Eine hydrophobe, hochmodifizierte, fluoreszierende Base in einer exponierten Position der tRNS-Struktur verstärkt die Adsorption an BD-Cellulose derart, daß diese tRNS nur durch sehr hohe

Salzkonzentrationen in den Elutionslösungen (33,34) oder durch den Zusatz von Äthanol desorbiert werden kann (35-38). Wenn aber alle isoakzeptierenden tRNS-Species einer Aminosäurespezifität gereinigt werden sollen, führt nur aufwendigere Methodik zum Ziel. Zunächst müssen diese Species so verändert werden, daß sie sich in chemischen Reaktionen oder in den vorher beschriebenen Reinigungsverfahren deutlich von anderen tRNS-Arten unterscheiden. Diese Veränderung gelingt mit der erforderlichen hohen Spezifität nur durch die von Aminosäure:tRNS-Ligase(AMP) katalysierte Aminoacylierung mit der entsprechenden Aminosäure. Die Veresterung mit der für die jeweils zu isolierenden Isoakzeptoren spezifischen Aminosäure stellt jedoch in den meisten Fällen gegenüber den unbeladenen tRNS-Arten eine physikochemisch zu geringfügige Veränderung dar, als daß sie sich auf das Chromatographieverhalten genügend auswirken würde. Wenn allerdings mit Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan aminoacyliert wird, werden die entsprechenden tRNS-Species durch die starke Interaktion der aromatischen Gruppen dieser Aminosäuren mit der benzoilylierten Oberfläche von BD-Cellulose bei Säulenchromatographie an dieser Matrix von den unbeladenen tRNS-Arten abgetrennt (39). In jedem Fall aber werden durch die Aminoacylierung mit der jeweiligen Aminosäure alle beladenen tRNS-Moleküle selektiv mit deren chemisch spezifischer  $\alpha$ -Aminogruppe ausgestattet. Durch

geeignete chemische Reaktionen mit der  $\alpha$ -Aminogruppe können jetzt Substituenten eingeführt werden, die durch ein genügend hohes Molekulargewicht oder durch besondere strukturelle Merkmale die so veränderten tRNS-Moleküle von der nicht derivatisierten tRNS abtrennbar machen (40-42). Derart gereinigte tRNS einer Aminosäurespezifität kann dann durch hochauflösende Säulenchromatographie in ihre Einzelspecies aufgetrennt werden. Methoden, die diese Kombination von enzymatischen und organisch-chemischen Verfahren nutzen, sind von ihrem theoretischen Konzept her generell anwendbar. Im einzelnen setzen die chemischen Eigenarten der jeweiligen Aminosäure und die Individualität der korrespondierenden tRNS-Species hier allerdings Grenzen, so daß die Wahl der für ein spezielles Vorhaben am besten geeignete Methode und die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen unter Umständen aufwendige Untersuchungen notwendig machen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Reindarstellung der lysinspezifischen tRNS-Einzelspecies aus Hühnerembryorümpfen und eine vergleichende Charakterisierung dieser reinen tRNS-Einzelspecies. In Vorversuchen war gezeigt worden, daß die Multiplizität der isoakzeptierenden lysinspezifischen tRNS-Arten in diesem Gewebe größer ist, als es der Degeneriertheit des genetischen Codes für Lysin entspräche (H.GOTTSCHLING, persönliche

Mitteilung), während in anderen Organismen oft nur zwei Species gefunden wurden (44-46). Eine Ausprägung von tRNS-Einzelspecies über eine "einfache Anpassung" an den genetischen Code hinaus in Verbindung mit der Tatsache, daß für lysinspezifische Transfer-Ribonucleinsäuren Voraussetzungen der "Wobble-Hypothese" (47) zutreffen, führte zur Wahl der tRNS<sup>Lys</sup>-Species als Gegenstand dieser Arbeit. Sie will an einem konkreten Beispiel molekulare Gegebenheiten aufklären helfen, deren Kenntnis Voraussetzung ist, will man einen Zugang zum Verständnis der biologischen Bedeutung der überschüssigen Multiplizität der tRNS-Adaptormoleküle gewinnen (48-50).

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1 Material

Polystyrol-(2% Divinylbenzol-Copolymer, chlormethyliert (sog. Merrifield-Harz), N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, N-Hydroxysuccinimid und 2-Naphthoxyessigsäure wurden von Schuchardt, München, bezogen.

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid und N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, L-Lysinmonohydrochlorid und benzoylierte DEAE-Cellulose stammten von Serva, Heidelberg.

Kieselgur- und Celluloseplatten für die Dünnschichtchromatographie waren von Merck, Darmstadt.

Kodak Professional Film (Nr. 6127) wurde über die Firma Beckman Instruments GmbH, München, bezogen.

Hochgereinigter Harnstoff ("Urea Ultrapure") und  $^3\text{H}$ -markiertes Guanosin-5'-diphosphat (9,5 Ci/mMol) waren von Schwarz-Mann, Orangeburg, N.Y.

Diadenosinmonophosphat der Firma Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim, wurde verwendet.

$^{14}\text{C}$ -markiertes L-Lysin (312 mCi/mMol) und  $^3\text{H}$ -markiertes L-Lysin (22,5 Ci/mMol) waren von NEN, Dreieichenhain.

$^{14}\text{C}$ -markiertes L-Lysin (287 mCi/mMol) und  $^3\text{H}$ -markiertes Adenosin-5'-diphosphat wurden von Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

Starterabhängige Polynucleotidphosphorylase (aus *Micrococcus luteus*), Alkalische Phosphatase (aus *E. coli*) und Ribonuclease- $\text{T}_1$  (aus *Aspergillus oryzae*) von Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, wurden eingesetzt.

Alle anderen Chemikalien und Lösungsmittel wiesen den Reinheitsgrad p.A. auf.

N,N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid und Äthylacetat wurden jeweils frisch destilliert. In Synthesen verwendetes Tetrahydrofuran und Dioxan wurden getrocknet und über Molekularsieben aufbewahrt.

Plaskon CTFE und Adogen 464 wurden dankenswerterweise von Dr. J.F. Weiss (Chemical Technology Division, Oak Ridge National Laboratory) zur Verfügung gestellt.

Für die Überlassung von Ribosomen und eines 100.000 x g-Überstandes aus *E. coli* danke ich Herrn Dr. V.A. Erdmann (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuche zur Reinigung von tRNS<sup>Lys</sup> durch Kopp- lung von (<sup>14</sup>C-)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> an Merrifield-Harz

#### 2.2.1.1 Herstellung des Carbobenzoxy-L-glutamatesters von N-Hydroxysuccinimid (51)

3 mMol Carbobenzoxy-L-glutamat und 3,6 mMol N-Hydroxy-succinimid wurden in 50 ml Äthylacetat gelöst. Dann wur-  
den unter Kühlung schnell 3,6 mMol N,N'-Dicyclohexylcar-  
bodiimid zugegeben. Nach kurzem heftigen Schütteln und  
10 Minuten Stehenlassen bei 4 °C wurde der Ansatz über  
Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Durch Filtrieren  
wurde N,N'-Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, mit 100 ml  
N,N-Dimethylformamid nachgewaschen und dann verworfen.  
Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer eingeengt, der  
kristalline Rückstand mit Diäthyläther gewaschen, ge-  
trocknet und unter Vakuum aufbewahrt.

#### 2.2.1.2 Synthese von Carbobenzoxy-L-glutamyl- (<sup>14</sup>C-)L-lysin

30 mg (79 µMol) Carbobenzoxy-L-glutamatester von N-Hy-  
droxysuccinimid wurden in 8 ml N,N-Dimethylformamid durch  
Erhitzen und heftiges Rühren gelöst. 2 mg (10,9 µMol)  
<sup>14</sup>C-markiertes L-Lysin (9 mCi/Mol) wurden in 0,5 ml eines  
0,1 M Triäthanolamin-Puffers, pH 8,0, gelöst und beide  
Lösungen unter heftigem Rühren vereinigt. Entsprechende  
Ansätze wurden mit L-Lysin in Wasser und in 0,1 M Acetat-

Puffer, pH 5,0, hergestellt.

Nach zwei Stunden Reaktionszeit wurden aus den Ansätzen jeweils 0,1 ml entnommen und der Chromatographie an Kieselgur-Dünnschichtplatten mit i-Butanol/Eisessig/Wasser (80:20:20; v/v/v) unterworfen. Auf den Platten anfärbbare Flecken wurden vollständig abgekratzt und in 10 ml eines Szintillationscocktails (4 g Omnifluor, 100 g Naphthalin, Dioxan ad 1 l) in einem Beckman LS 150-Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Durch externe Standardisierung angezeigte unterschiedliche Zählausbeuten in den Proben wurden berücksichtigt. Die Korrektur erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, in der die Zählausbeuten für eine bekannte konstante Menge  $^{14}\text{C}$ -markiertes L-Lysin in Abhängigkeit vom externen Standardisierungsfaktor aufgetragen waren, der durch unterschiedliche Mengen Kieselgur im Szintillationscocktail variiert wurde. Es wurde der Anteil  $^{14}\text{C}$ -markierten Materials in Prozent der Summe der aus allen Flecken eines Versuches gewonnenen Radioaktivität ermittelt.

#### 2.2.1.3 Anfärbung der Dünnschichtchromatographieplatten

Zur Färbung der N-geschützten Aminosäure und des Dipeptids wurde nach vorherigem Nachweis der Ninhydrin-positiven Substanzen der Chlor-Tolidin-Test (52) benutzt. Die Platten wurden 15-20 Minuten einer Chloratmosphäre

ausgestzt ( $1,5\% \text{KMnO}_4/10\% \text{HCl}$ ; 1:1; v/v), 3-5 Minuten unter dem Abzug gelüftet und mit o-Tolidinlösung (160 mg o-Tolidin in 30 ml Eisessig lösen,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 500 ml, 1 g KJ zugeben) dünn besprüht.

#### 2.2.1.4 Veresterung von Carbobenzoxy-L-glutamat mit chlormethyliertem Styrolcopolymer (53)

33,75 g (120 mMol) Carbobenzoxy-L-glutamat wurden in einem 1 l-Rundkolben in 500 ml Äthylacetat gelöst und unter heftigem Rühren mit 33,6 ml (240 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach Zugabe von 10 g chlormethyliertem (1,5 mMol/g Harz) Styrol-(2% Divinylbenzol)-Copolymer wurde die Suspension 24 Stunden unter Rückfluß gerührt. Das Merrifield-Harz wurde dann durch Filtration abgetrennt, mit jeweils 100 ml Äthylacetat, Äthylacetat/Äthanol (1:1), Äthanol, Äthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1), Äthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), Äthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:2),  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ /Methanol (1:2) und abschließend mit 400 ml Methanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

#### 2.2.1.5 Hydrolyse des Carbobenzoxyglutamyl-Styrolcopolymers (53) und Bestimmung des freigesetzten Glutamats (54)

Zu 50 mg Carbobenzoxyglutamyl-Styrolcopolymer wurden 10 ml Essigsäure und 10 ml 6 N HCl gegeben und 24 Stunden unter Rückfluß hydrolysiert. Dann wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf

100 ml aufgefüllt, mit 5 N NaOH auf pH 5,4 gebracht und dann weiter mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt. Zur Bestimmung des freigesetzten Glutamats wurden 2 ml entnommen, 1 ml Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, und 1 ml Ninhydrinlösung (20 g Ninhydrin, 4 g Na-Cyanid, 50% Methylcellosolve ad 100 ml) zugegeben. Das verschlossene Probenröhrchen wurde 20 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert. Dann wurden 10 ml Isopropanol/H<sub>2</sub>O (1:1; v/v) zugegeben. 10 Minuten später wurde die Extinktion der Probe bei 570 nm gegen eine entsprechende Referenzlösung gemessen. Aus einer Eichkurve, in der die Extinktion bei 570 nm gegen Glutamatkonzentrationen von 0,01-0,2 mM aufgetragen war, wurde die jeweilige Glutamatkonzentration abgelesen.

#### 2.2.1.6 Herstellung des N-Hydroxysuccinimid-Esters von Carbobenzoxy-L-glutamyl-Styrolcopolymer

Es wurde ein Reaktionsgefäß (3x10 cm) benutzt, dessen Auslauf mit einer großporigen Teflonfritte und einem Glasabsperrhahn und dessen oberer Schliffansatz mit einem Drei-Wege-Hahn-Zulauf für die Lösungsmittel versehen war; letzterer konnte für schnelles Rühren von oben offengelassen oder für Rotationsbewegungen mit einem Glasstopfen verschlossen werden. Diese Reaktionsgefäß entsprach im wesentlichen dem Abspaltungsgefäß von MERRIFIELD (55).

6 g Carbobenzoxyglutamyl-Styrolcopolymer (entsprechend

3,2 mMol Glutamat) wurden in das Reaktionsgefäß gegeben und in 5 ml Dimethylsulfoxid 10 Minuten gequollen. 368 mg N-Hydroxysuccinimid (3,2 mMol) in 5 ml Dimethylsulfoxid wurden dann unter Rühren zugegeben. Aus 1,3 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (6,3 mMol) und 2 ml Dimethylsulfoxid wurde durch Erwärmen und Schütteln eine Emulsion gebildet und schnell unter heftigem Rühren in das Reaktionsgefäß gespritzt. Nach 2 Minuten wurde das Gefäß verschlossen und das Harz 10 Stunden unter langsamer Rotation (ca. 20 U/min) bewegt. Danach wurde das Harz trockengesaugt, zweimal mit je 200 ml Dimethylsulfoxid, dann mit je 100 ml Dimethylsulfoxid/Äthanol (4:1, 3:2 und 1:1) gewaschen und 48 Stunden unter Vakuum getrocknet. Die Ausbeute wurde durch Wägen bestimmt.

#### 2.2.1.7 Synthese von ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-carbobenzoxylutamyl-Styrolcopolymer

300 mg N-Hydroxysuccinimidester von Carbobenzoxylutamyl-Styrolcopolymer wurden im Reaktionsgefäß in 2 ml Dimethylsulfoxid 20 Minuten gerührt. Nach Zugabe von 1 mg (5,45  $\mu\text{Mol}$ ) ( $^{14}\text{C}$ -)Lysin (92 mCi/Mol) in 0,5 ml 0,1 M Triäthanolaminpuffer, pH 8,0, wurde über Nacht langsam rotiert. Das Harz wurde trockengesaugt und mit Dimethylsulfoxid, Äthanol,  $\text{H}_2\text{O}$  und wieder Äthanol gewaschen (Gesamtvolumen 300 ml), bis keine Radioaktivität mehr in den Waschlösungen nachweisbar war. Radioaktive Proben

wurden auf Rundfilter gegeben und bei 180 °C getrocknet. Ihre Radioaktivität wurde in einem Szintillationscocktail ( 4 g Omnifluor, 100 g Naphthalin, Dioxan ad 1 l) in einem Beckman LS 150-Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Aus einer Eichkurve (siehe 2.2.1.2) für die Zählausbeuten bei Äthanol/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) -quenching wurden die Zerfälle pro Minute für jede Probe ermittelt.

#### 2.2.1.8 Kopplung von (<sup>14</sup>C-)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> an Carbobenzoxylglutamyl-Styrolcopolymer

6 g N-Hydroxysuccinimidester von Carbobenzoxylglutamyl-Styrolcopolymer wurden in das Reaktionsgefäß gegeben und in 40 ml Dimethylsulfoxid gequollen, abgesaugt und erneut in 20 ml Dimethylsulfoxid 30 Minuten gerührt. 1000 E<sub>260nm</sub>-Einheiten Gesamt-tRNS in 5 ml 0,1 M Triäthanolamin-Puffer, pH 4,0, die 31,6 nMol (<sup>14</sup>C-)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> enthielten, wurden langsam in eine Lösung aus 1 ml 0,1 M Triäthanolamin-Puffer, pH 4,0, und 5 ml Dimethylsulfoxid gegeben und unter Rühren in das Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde mit 1 N NaOH auf pH 8,3 eingestellt, das Gefäß verschlossen und zwei Stunden rotiert. Dann wurde mit Eisessig auf pH 5,0 eingestellt und das Harz trocken-  
gesaugt. Die eluierte tRNS wurde mit zwei Volumen Äthanol gefällt. (<sup>14</sup>C-)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> wurde vor und nach der Reaktion durch Zählung der Radioaktivität von 50 µl-Anteilen bestimmt, die auf Rundfiltern adsorbiert und, wie

unter 2.2.2.2 beschrieben, gewaschen worden waren.

#### 2.2.1.9 Abspaltung der tRNS<sup>Lys</sup> von (<sup>14</sup>C-)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-carbobenzoxyglutamyl-Styrolcopolymer

30 ml 1M Tris-HCl-Puffer, pH 9,3, (57) wurden zu dem Harz in das Reaktionsgefäß gegeben. Diese Suspension wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur rotiert. Das Harz wurde trockengesaugt und mit 30 ml 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,3, nachgewaschen. Beide Tris-HCl-Puffer-Fraktionen wurden vereinigt und bei 35 °C im Rotationsverdampfer eingeeengt, bis die E<sub>260</sub> 1,5 war. Nach ausgiebiger Dialyse gegen H<sub>2</sub>O wurde die tRNS mit zwei Volumen Äthanol gefällt, abzentrifugiert und in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst. An Aliquoten dieser Lösung wurde die Lysin-Akzeptorkapazität bestimmt.

#### 2.2.2 Reinigung von tRNS<sup>Lys</sup> durch Derivatisierung von (<sup>14</sup>C-)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>, Chromatographie an BD-Cellulose und Reversed-Phase-5-Chromatographie

##### 2.2.2.1 Isolierung von tRNS und Präparation einer für L-Lysin:tRNS-Ligase(AMP) angereicherten Fraktion

Die Isolierung der Gesamt-tRNS-Fraktion aus der Muskulatur von 13 Tage alten Hühnerembryonen durch wiederholte Phenolextraktionen, Fällungen mit Äthanol und differentielle 2-Propanol-Fällungen wurde veröffentlicht (56). Dort ist auch die Anreicherung der L-Lysin:tRNS-Ligase (AMP) durch BaCl<sub>2</sub>-, Strptomycin- und differentielle

Ammoniumsulfatfällungen und durch Chromatographie an DEAE-Cellulose beschrieben.

### 2.2.2.2 Aminoacylierung von tRNS<sup>Lys</sup>

Die Aminoacylierung von tRNS<sup>Lys</sup> wurde im analytischen Maßstab in 0,3 ml-Ansätzen durchgeführt, deren Bestandteile in folgenden Endkonzentrationen vorlagen:

30 mM Tris-HCl, pH 7,5

25 mM MgCl<sub>2</sub>

2 mM ATP

0,4 mM EDTA

8,3 µM <sup>14</sup>C-markiertes L-Lysin (50Ci/Mol)

bzw. 8,3 µM <sup>3</sup>H-markiertes L-Lysin (22,5 Ci/Mol)

0,02-3,6 µM tRNS<sup>Lys</sup> (abhängig vom Reinheitsgrad)

Zu jedem Ansatz wurde so viel von der L-Lysin:tRNS-Ligase(AMP)-Präparation gegeben, daß vollständige Beladung der tRNS mit Lysin in 10 Minuten gewährleistet war. Nach Präinkubation von Enzym und tRNS (3 Minuten bei 37 °C) wurde die Aminoacylierungsreaktion durch Zugabe eines Reaktionsgemisches aus radioaktiv markiertem Lysin, ATP und MgCl<sub>2</sub> in Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, bei 37 °C gestartet. Nach geeigneten Inkubationszeiten wurden zur Bestimmung radioaktiver Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> 50 µl entnommen und auf Rundfilter (Ø 22 mm) verteilt. Die Plättchen wurden sofort in eiskalte 10%-ige TCA-Lösung (10 ml pro Plättchen) geworfen, dreimal in 5%-iger TCA-Lösung gewaschen, über

Äthanol, Äthanol/Diäthyläther (1:1, v/v) in Diäthyläther überführt und getrocknet. Die durch Säure fällbare Radioaktivität wurde in 5 ml Szintillationscocktail (siehe 2.2.1.7) in einem Nuclear Chicago Isocap/300-Flüssigkeitsszintillationssystem gezählt.

Die Aminoacylierung von tRNS<sup>Lys</sup> im präparativen Maßstab wurde wie von WITTIG et al. (56) beschrieben durchgeführt. 10 640 E<sub>260nm</sub>-Einheiten Gesamt-tRNS wurden in 10 Portionen mit <sup>14</sup>C-markiertem Lysin beladen. In einem 100 ml-Erlenmeyerkolben wurden jeweils 30 ml Gesamt-tRNS, 15 ml der Lysin:tRNS-Ligase(AMP)-Präparation (diese wurde unmittelbar vorher dialysiert, um eventuell entstandene freie Aminosäuren zu entfernen) und 10 ml des Reaktionsgemisches 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Erlenmeyerkolben in eine Kühlsole (Eis/Methanol/Kochsalz) gestellt und schnell mit 10 ml eines 1 M Na-Acetat-Puffers, pH 5,0, versetzt. Alle 10 Portionen wurden vereinigt in ein gleiches Volumen Phenol (redestilliert, 80%) gegeben. Es wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur heftig gerührt und dann bei 20.000 x g in einer Sorvall-Zentrifuge 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgehoben (wegen der nachfolgenden Derivatisierung muß eine Kontaminierung durch Interphase-Protein unbedingt vermieden werden). Die Phenol- und Interphase wurde mit

50 ml 1 M Na-Acetat, pH 5,0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  reextrahiert. Aus den vereinigten wässrigen Phase wurde die tRNS mit 2 Volumen kaltem ( $-30^\circ\text{C}$ ) Äthanol gefällt.

#### 2.2.2.3 Herstellung des 2-Naphthoxyacetylesters von N-Hydroxysuccinimid

2-Naphthoxyacetylestern von N-Hydroxysuccinimid wurde nach der Anweisung von ANDERSON (59) hergestellt. Äquimolare Mengen von 2-Naphthoxyessigsäure und N-Hydroxysuccinimid wurden in wasserfreiem Dioxan gelöst. Nach Zugabe einer äquimolaren Menge N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid wurde kräftig geschüttelt. Es bildete sich sofort ein grün-weißer Niederschlag (N,N'-Dicyclohexylharnstoff), der nach 2 Stunden durch Filtration abgetrennt, mehrmals mit Dioxan gewaschen und dann verworfen wurde. Das Filtrat wurde mit den Waschfraktionen vereinigt und im Rotationsverdampfer zu einer gelb-grünen, viskösen Lösung eingeeengt, die spontan kristallisierte. Die Esterausbeute nach der ersten Kristallisation betrug 65%. Die Substanz wurde noch zweimal aus 1-Propanol umkristallisiert und über  $\text{P}_2\text{O}_5$  im Vakuum aufbewahrt.

#### 2.2.2.4 Synthese von 2-Naphthoxyacetyl-lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>

Die präzipitierte Gesamt-tRNS, in der die ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> enthalten ist (siehe 2.2.2.2), wurde in 50 ml 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 M Triäthanolaminhydrochlorid, pH 4,5,

gelöst und 3 Stunden gegen den gleichen Puffer (6 x 1 l) dialysiert. Die tRNS-Lösung wurde dann auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden schnell 150 mg 2-Naphthoxyacetylerster von N-Hydroxysuccinimid in 10 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gegeben. Innerhalb von einer Minute wurde mit 18 ml 1 N NaOH pH 8,6 eingestellt. Nach 5 Minuten wurden erneut 150 mg des Esters in 10 ml Tetrahydrofuran zugegeben; mit 1 ml NaOH wurde wieder pH 8,6 eingestellt. Nach 5 Minuten wurde der pH mit 3,4 ml Eisessig auf 4,5 gebracht und die tRNS mit 2 Volumen Äthanol gefällt. Während des gesamten Reaktionsablaufes wurde die Temperatur der Lösung bei 0 °C gehalten, wozu eine Temperatur der Kühlsole von ungefähr -10 °C notwendig war.

Zur vorhergehenden Ermittlung der hier beschriebenen Derivatisierungsbedingungen wurden 100  $E_{260nm}$ -Einheiten tRNS mit  $^{14}C$ -markiertem Lysin beladen. Freies  $^{14}C$ -markiertes Lysin, Protein und ATP wurden durch DEAE-Cellulose-Chromatographie (siehe 2.2.2.7) abgetrennt. Fraktionen dieser ( $^{14}C$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Präparation wurden unter unterschiedlichen Bedingungen derivatisiert, wobei die Tetrahydrofurankonzentration und der pH variiert wurden. Die derivatisierten ( $^{14}C$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Fraktionen wurden dann jeweils auf kleine BD-Cellulose-Säulen (0,6x7 cm) gegeben, die in Pasteurpipetten angesetzt und vorher mit 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Essigsäure,

pH 5,0, äquibriert worden ear. Die tRNS wurde dann mit 0,8 M NaCl (Pool A) und 1 M NaCl/20% Äthanol (Pool B) im gleichen Puffer eluiert. Die in Pool B gemessene, säurefällbare Radioaktivität (repräsentativ für 2-Naphthoxyacetyl-( $^{14}\text{C}$ -)lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> in Prozent der insgesamt aus Pool A und B zurückgewonnenen säurefällbaren Radioaktivität wurde ermittelt (Tabelle 2).

#### 2.2.2.5 Chromatographie an BD-Cellulose

Säulen für die Chromatographie an BD-Cellulose wurden, wie von GILLAM et al. (60) beschrieben, gefüllt und äquibriert. Es wurde festgestellt, daß die in diesen Experimenten benutzte BD-Cellulose nur ungefähr 1/3 der Kapazität des von GILLAM et al. hergestellten Materials hatte, weshalb entsprechend größere Säulen verwendet wurden. BD-Cellulose, die längere Zeit äthanolhaltigen Puffern ausgesetzt war, wurde nicht wieder verwendet. Einzelheiten der Chromatographie sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

#### 2.2.2.6 Hydrolyse der Aminoacyl-Esterbindung von

2-Naphthoxyacetyl-( $^{14}\text{C}$ -)lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>

2-Naphthoxyacetyl-( $^{14}\text{C}$ -)lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> wurde in 1,8 M Tris-HCl, pH 8,0, gelöst und langsam bei Raumtemperatur 2 Stunden gerührt (57). Nach Einstellen mit Eisessig auf pH 5,0 wurde mit 2 Volumen Äthanol gefällt.

### 2.2.2.7 Wiederholung des Reinigungsverfahrens an

$\text{tRNS}_{\text{III}}^{\text{Lys}}$  und  $\text{tRNS}_{\text{IV}}^{\text{Lys}}$

Pool 4b und 4c (siehe Abb.1 und Abb.2) wurden vereinigt mit Äthanol gefällt. Der Niederschlag wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die präparative Beladung mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Lysin wurde dann, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, durchgeführt mit dem Unterschied, daß nach Beendigung der Aminoacylierungsreaktion und Einstellung des pH auf 5,0 die vereinigten Ansätze mit einem Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (3x12 cm) gegeben wurden, die vorher mit 0,2 M NaCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 5,0, äquilibriert worden war. Mit 500 ml des gleichen Puffers wurden freies Lysin, Protein und ATP von der Säule gewaschen. Anschließend wurde die tRNS mit 2 M NaCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 5,0, desorbiert (61). Um ein Verstopfen der Säule zu vermeiden, muß bei pH 5,0 ausgefallenes Protein vorher durch niedertourige Zentrifugation abgetrennt werden.

( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> wurde dann, wie unter 2.2.2.4 beschrieben, derivatisiert und durch Chromatographie an BD-Cellulose von unbeladener tRNS abgetrennt (Abb.4 und Tabelle 3).

### 2.2.2.8 Reversed-Phase-5-Chromatographie

Das Harz für die Reversed-Phase-5-Chromatographie wurde nach der Anweisung C von PEARSON et al. (62) aus Plas-

kon CTFE und Adogen 464 hergestellt. Zu 100 g Plaskon CTFE in einer 800 ml-Flasche (weiter Hals) wurden 4 ml Adogen 464 in 200 ml Chloroform (p.N.) gegeben. Die Flasche wurde dann an einem Rotationsschüttler befestigt und 2 Stunden mit der höchsten Geschwindigkeit geschüttelt. Die Längsachse der Flasche wurde so gegen die Rotationsbewegung geneigt, daß dem Flascheninhalt keine synchrone Rotationsbewegung aufgezwungen wurde, um eine möglichst effektive Homogenisierung der Partikel zu erreichen. Die Suspension wurde dann in eine große Petrischale gegossen und unter dem Abzug mit einem Glasrührer ungefähr eine Stunde gerührt, bis ein zähflüssiger Brei entstanden war. Dieser wurde dann über Nacht in einer 250 ml-Flasche, die mit vier Lagen Filterpapier verschlossen wurde, durch langsame, taumelnde Drehbewegungen durchmischt, um ein gleichmäßiges Verdampfen des Chloroforms zu gewährleisten. RPC-5-Säulen wurden unter hohem Druck gestopft, nachdem das Harz vorher mit 0,4 M NaCl, 0,01 M  $MgCl_2$ , 0,01 M Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM 2-Mercaptoäthanol geschlemmt worden war (4 l Puffer /30 g Harz).

## 2.2.3 Charakterisierung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species

### 2.2.3.1 Spaltung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species mit RNase-T<sub>1</sub> und Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Oligonucleotide

Verdauung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species mit RNase-T<sub>1</sub> wurde in

0,1 ml-Ansätzen durchgeführt, die 1  $E_{260nm}$ -Einheit der jeweiligen tRNS<sup>Lys</sup> und 25 Einheiten des Enzyms in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, enthielten. Es wurde bei 0 °C 60 Minuten inkubiert (63), und dann das Inkubationsgemisch zweimal mit Phenol (redestilliert, 80%) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zur Entfernung des Phenols fünfmal mit Diäthyläther ausgeschüttelt und dann auf Polyacrylamidgele in Quarzröhrchen (0,6x10 cm) gegeben. Es wurden Gele aus 16% Acrylamid und 1,3% Methylbisacrylamid mit 7 M Harnstoff eingesetzt; dabei wurde das Diäthylbarbitursäure-Tris-HCl-Puffersystem von RICHARD et al. (64) benutzt. Unmittelbar nach der Elektrophorese wurde in einem Gilford Spectrophotometer 2400-S die Extinktion bei 280 nm entlang den Gelen in den Quarzröhrchen gemessen. Einzelheiten der Polyacrylamidgel-Elektrophorese sind bei REUTER (65) beschrieben.

### 2.2.3.2 Synthese der Oligoribonucleotide ApApGpA und ApApApA

Die Oligoribonucleotide ApApGpA und ApApApA mit einem <sup>3</sup>H-markierten Adenin am 3'-Ende wurden mit Hilfe von starterabhängiger Polynucleotidphosphorylase nach PONGS et al. (66) synthetisiert.

#### 2.2.3.2.1 Synthese von ApApGpA

350 µl ApA (6 mM), 150 µl GDP (10 mM), 200 µl PNPase

(1 mg/ml) und 50  $\mu$ l RNase-T<sub>1</sub> (1 mg/ml), alle in 0,4 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 M Glycin, pH 9,3, wurden zusammen 22 Stunden bei 37 °C inkubiert. PNPase wurde dann durch kurzes Erhitzen (100 °C, 2 Minuten) denaturiert. Darauf wurde der Ansatz mit 100  $\mu$ l Alkalischer Phosphatase bei 37 °C 3 Stunden inkubiert, um noch verbliebenes GDP, das sich bei der folgenden Chromatographie an DEAE-Cellulose nur schlecht vom Trinucleosiddiphosphat ApApG abtrennen ließe, zu Guanosin zu dephosphorylieren. Der Ansatz wurde dann 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und auf einer DEAE-Cellulose-Säule (3x10 cm) mit H<sub>2</sub>O eingewaschen, bis im Eluat keine Extinktion bei 260 nm mehr nachweisbar war. ApA und ApApG wurden dann mit einem linearen Salzgradienten aus 200 ml H<sub>2</sub>O und 200 ml 0,2 M Triäthylammoniumbicarbonat eluiert. ApApG wurde im Rotationsverdampfer getrocknet und anschließend noch zweimal mit Methanol/Wasser (1:1, v/v) gewaschen. Danach wurde es in 300  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Whatman 3 MM-Papier durch absteigende Chromatographie in 1 M Ammoniumacetat, pH 7,2 /Äthanol (50:50, v/v) weiter gereinigt. Identifiziert wurde ApApG unter UV-Licht aufgrund seiner Position relativ zur Position von Ap und ApA, die als Referenzen mitliefen. Das Trinucleosiddiphosphat wurde dann in Kapillaren hinein mit 1 ml Glycin-Puffer (0,4 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 M Glycin, pH 9,3) eluiert. Die Ausbeute betrug 1,6 E<sub>260nm</sub>-Einheiten.

Zur Synthese von ApApGpA wurden inkubiert:

50  $\mu$ l ApApG ( $E_{260} = 1,63$ ) in Glycin-Puffer

5  $\mu$ l  $^3\text{H}$ -markiertes ADP (15 Ci/mMol), Na-Salz  
in Äthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, v/v)

10  $\mu$ l PNPase (1 mg/ml) in Glycin-Puffer

Nach Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden wurde die PNPase durch Erhitzen (100 °C, 2 Minuten) denaturiert, der Ansatz mit 10  $\mu$ l Alkalischer Phosphatase bei 37 °C 3 Stunden inkubiert und die Reaktionsprodukte durch absteigende Chromatographie auf Papier (Schleicher u. Schüll 2043 b, MgI) mit 1 M Ammoniumacetat, pH 7,2 /Äthanol (50:50, v/v) aufgetrennt. ApApGpA wurde mit Hilfe des Berthold-Dünnschichtscanners identifiziert und mit ungefähr 100  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  in eine Kapillare hinein eluiert.

#### 2.2.3.2.2 Synthese von ApApApA

Zur Synthese von ApApApA wurden inkubiert:

50  $\mu$ l ApA (16 mM) in 0,15 M NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  
0,4 mM EDTA, 0,15 M Tris-HCl, pH 9,5

5  $\mu$ l ( $^3\text{H}$ -)ADP (15 Ci/mMOL),  $\text{NH}_4$ -Salz in Äthanol/ $\text{H}_2\text{O}$

10  $\mu$ l PNPase (1 mg/ml) im gleichen Puffer  
wie ApA

Nach Inkubation bei 37 °C für 4 Stunden wurde weiter verfahren wie unter 2.2.3.2.1.

### 2.2.3.3 Gleichgewichtsdialyse

Gleichgewichtsdialysen wurden in 50  $\mu$ l-Plexiglaskammern, wie sie von UHLENBECK et al. (67) beschrieben worden sind, durchgeführt. Jede der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species wurde gegen 1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Na-Phosphat, pH 7,0, dialysiert und die E<sub>260</sub> gemessen. Jeweils eine tRNS<sup>Lys</sup>-Species und eins der beiden 1:10 verdünnten (1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Na-Phosphat, pH 7,0) Tetramere ApApGpA oder ApApApA wurden in die jeweiligen, durch sterilen Dialyseschlauch getrennten Hälften der Dialyskammern eingefüllt und bei -2 °C 48 Stunden dialysiert. Die Kammern wurden mit Preßluft auf ein Stück Parafilm ausgeblasen, und aus jeder Kammerhälfte wurde dreimal an je 10  $\mu$ l in Bray'scher Lösung (68) (4 g PPO, 0,2 g POPOP, 100 ml Methanol, 20 ml Äthylenglykol, Dioxan ad 1 l) die Radioaktivität bestimmt.

Es wurden tRNS-Konzentrationen zwischen 35 und 54  $\mu$ M eingesetzt, die Tetramer-Konzentration war ungefähr 10 nM. Zur Berechnung der jeweiligen molaren tRNS-Konzentration wurden die ermittelten individuellen Molekulargewichte benutzt (siehe 2.2.3.6). Unter der Annahme, daß es nur eine Tetramer-Bindungsstelle pro tRNS-Molekül gibt, und wegen des großen Überschusses an tRNS kann die beobachtete Assoziationskonstante in diesem System nach der Gleichung  $K_{obs}^{ass} = C_{tRNS}^{-1} (R-1)$  berechnet werden, wobei  $C_{tRNS}$  die tRNS-Konzentration und R das Verhältnis

von  $^3\text{H}$ -Radioaktivität in der tRNS-Kammerhälfte zu der in der Tetramer-Kammerhälfte.

#### 2.2.3.4 Poly(A)-gesteuerte Polylysinsynthese

Das von CRONENBERGER und ERDMANN (69) beschriebene von Poly(U) abhängige Polyphenylalanin synthetisierende ribosomale E. coli-System wurde zu einem von Poly(A) gesteuerten Polylysinsynthetisierenden System modifiziert. In jedem Ansatz wurden anstatt Phenylalanin und Poly(U)  $^{14}\text{C}$ -markiertes Lysin (siehe Tabelle 5) bzw. 20  $\mu\text{g}$  Poly(A) eingesetzt und ungefähr 0,6  $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten einer der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species sowie 2,5  $\mu\text{g}$  Protein der L-Lysin:tRNS-Ligase(AMP)-Präparation zugefügt. Die Proben wurden bei 40 °C 45 Minuten inkubiert, mit 5% TCA, 0,25% Na-Wolframat, pH 2, gefällt, 5 Minuten bei 100 °C inkubiert, durch GFC-glass-Filter (Whatman) filtriert und mit der gleichen Lösung gewaschen (70).

#### 2.2.3.5 Bestimmung der Halbwertszeiten der Aminoacyl-Esterbindung

Die Halbwertszeiten der Aminoacyl-Esterbindung wurden durch schnelle nucleophile Katalyse bestimmt. Jede der tRNS<sup>Lys</sup> wurde in einem Gesamtvolumen von 0,15 ml mit hoch  $^3\text{H}$ -markiertem Lysin (22,5 Ci/mMol) beladen. Nach Inkubation bei 37 °C für 20 Minuten wurde Na-Acetat, pH 5,0, bis zu einer Endkonzentration von 0,1 M zugege-

ben und das Protein durch Phenolextraktion entfernt. Die wässrigen Phasen wurden dreimal mit Diäthyläther ausgeschüttelt. Die jeweiligen ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Lösungen wurden dann in einem Schüttelbad 1 Minute bei 37 °C präinkubiert. Nach Zugabe von 37 °C-warmem Tris-HCl, pH 9,0, bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M wurden in Abständen von einer Minute 25 µl-Anteile entnommen und auf Rundfilter gegeben, die , wie unter 2.2.2.2 beschrieben, gewaschen und ausgewertet wurden. Die so ermittelte säurefällbare Radioaktivität wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und zeigte dabei einen linearen Abfall. Regressionsgeraden wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Danach ist die Steigung der Geraden durch  $a = \frac{\sum \log y_i (x_i - \bar{x})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$  und der y-Achsenabschnitt durch  $b = \log \bar{y} - a\bar{x}$  definiert, wobei  $\bar{x}$  und  $\bar{y}$  die Mittelwerte aus den Einzelwerten der Verseifungszeiten  $x_i$  und den dazugehörigen Einzelwerten der ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Mengen  $y_i$  sind.

#### 2.2.3.6 Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten und Berechnung der Molekulargewichte

Sedimentationskoeffizienten wurden durch Hochgeschwindigkeitsläufe bei 50740 U/min und 20 °C in einer Beckman Model E Analytischen Ultrazentrifuge, die mit einer UV-Optik ausgerüstet war, ermittelt. Für alle Läufe wur-

de die gleiche Standard-Zelle mit einem 12 mm-Mittelstück und Quarzfenstern benutzt. Die UV-empfindlichen Filme wurden 10 Sekunden belichtet und mit Kodak-Entwickler D-19 bei Raumtemperatur 4 Minuten entwickelt. In einem mit Filmscanner ausgerüsteten Gilford Spectrophotometer 2400-S wurde dann die Extinktion bei 550 nm entlang den Filmen in einer stark vergrößerten Aufzeichnung des angeschlossenen Extinktionsbereiches wiedergegeben. Als Puffer wurde 0,2 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10 mM Na-Cacodylat, pH 7,0, benutzt. Die tRNS-Konzentrationen lagen zwischen 25 und 50 µg/ml. In Vorversuchen war festgestellt worden, daß bei diesen geringen Konzentrationen keine Abhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten von der Konzentration nachweisbar ist. Für jede der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species wurden drei bis fünf voneinander unabhängige Läufe durchgeführt, von jedem Lauf wurden 10 Einzel-Photos ausgewertet. Der beobachtete Sedimentationskoeffizient kann definiert werden als

$$s = \frac{2,303}{\omega^2 60} \frac{d \log x}{d t} ,$$

wobei  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit in  $\frac{2\pi}{\text{sec}}$  mit  $\nu$  in  $\frac{U}{\text{sec}}$ ,  $x$  die Entfernung der Grenze zwischen Lösungsmittel und Lösung vom Zentrum der Rotation in cm und  $t$  die Zeit in Minuten ist (72). Da die Sedimentationsgeschwindigkeit in erster Annäherung von der Zeit unabhängig ist,

kann die Gleichung integriert werden, und man erhält

$$\log x = \frac{\omega^2 60}{2,303} s \cdot t + \text{const}.$$

Wird also in einer graphischen Darstellung  $\log x$  gegen  $t$  aufgetragen, erhält man eine Gerade mit der Steigung  $\frac{\omega^2 60}{2,303} s$ . Die so ermittelten  $s$ -Werte wurden für Läufe unter Standardbedingungen in Wasser und bei  $20^\circ\text{C}$  nach folgender Gleichung korrigiert (73):

$$s_{20^\circ, w} = s \left[ \frac{\eta_{t^\circ, w}}{\eta_{20^\circ, w}} \right] \left[ \frac{\eta_{t^\circ, \text{sol}}}{\eta_{t^\circ, w}} \right] \left[ \frac{1 - \bar{v} \rho_{20^\circ, w}}{1 - \bar{v} \rho_{t^\circ, \text{sol}}} \right]$$

Hier sind:  $\eta_{t^\circ, w}$  die Viskosität von  $\text{H}_2\text{O}$  bei einer Temperatur  $t^\circ\text{C}$

$\eta_{20^\circ, w}$  die Viskosität von  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $20^\circ\text{C}$

$\eta_{t^\circ, \text{sol}}$  die Viskosität der tRNS-Lösung bei einer Temperatur  $t^\circ\text{C}$

$\bar{v}$  das partielle spezifische Volumen von tRNS

$\rho_{20^\circ, w}$  die Dichte von  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $20^\circ\text{C}$

$\rho_{20^\circ, \text{sol}}$  die Dichte der tRNS-Lösung bei  $20^\circ\text{C}$

$\rho_{t^\circ, \text{sol}}$  die Dichte der tRNS-Lösung bei einer Temperatur  $t^\circ\text{C}$

Es wurde angenommen, daß  $\rho_{t^\circ, \text{sol}} \approx \frac{\rho_{20^\circ, \text{sol}}}{\rho_{20^\circ, w}} \rho_{t^\circ, w}$  ist (73).

Die entsprechenden Werte für  $\eta$  und  $\rho$  sind bei SVEDBERG und PEDERSEN (74) aufgeführt.  $\bar{v} = 0,506 \text{ ml/g}$  für native

tRNS wurde von ADAMS et al. (75) bestimmt.

Molekulargewichte wurden nach der Scheraga-Mandelkern-Gleichung berechnet:

$$M^{2/3} = s_{20,w}^0 [\eta]^{1/3} \eta_0 N / \beta (1 - \bar{v} \rho)$$

Hier sind:  $\eta$  die Viskositätszahl, d.h. die auf die Konzentration 0 extrapolierte, reduzierte Viskosität

$\eta_0$  die Viskosität des Lösungsmittels

$N$  die Avogadro'sche Zahl

$\beta$  ein empirisch ermittelter Faktor, der durch diese Gleichung definiert wird.

Folgende Werte nach ADAMS et al. wurden eingesetzt:

$$\beta = 1,99 \cdot 10^6, \bar{v} = 0,506 \text{ ml/g}, \eta = 0,047 \text{ dl/g}.$$

#### 2.2.3.7 Analyse der temperaturabhängigen Extinktionstransitionen

Das Schmelzen von tRNS und die Auswertung der experimentellen Daten wurde ausführlich beschrieben (65,71).

Als Puffer wurde in allen Versuchen 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA, 10 mM Na-Cacodylat, pH 6,8, benutzt. Für den Übergang der tRNS-Moleküle vom gefalteten in den entfalteten Zustand wurde ein Alles-Oder-Nichts-Verhalten angenommen.

Die beobachtete Gleichgewichtskonstante dieses Systems ergibt sich aus  $K_{\text{obs}}^{\text{äqu}} = f_u / (1 - f_u)$ , wobei  $f_u$  den Anteil der entfalteten Moleküle repräsentiert. Zur Berechnung der Enthalpieänderung des Systems wurden Mittelwerte aus

vier oder fünf unabhängigen Schmelzexperimenten eingesetzt. Die Änderung der Standard-Enthalpie wird durch die Van't Hoff-Gleichung definiert:

$$\Delta H^{\circ} = -R \left[ \partial \ln K_{\text{obs}}^{\text{äqu}} / \partial (T^{-1}) \right]_p$$

Da  $\Delta H^{\circ}$  in erster Annäherung von der Temperatur unabhängig ist, erhält man durch Auftragen von  $\log K_{\text{obs}}^{\text{äqu}}$  gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur T eine Gerade mit der Steigung  $-\Delta H^{\circ}/2,303 R$ . Die Regressionsgeraden für diese Van't Hoff-Darstellungen wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Versuche zur Kopplung von ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> an Merrifield-Harz

Die kovalente Bindung von Aminoacyl-tRNS an eine feste Phase stellt für das hier zu Grunde gelegte theoretische Konzept eine optimale Lösung dar: zuerst werden alle tRNS-Arten gleicher Aminosäurespezifität durch enzymatische Beladung mit eben dieser Aminosäure von der restlichen tRNS chemisch unterscheidbar gemacht; anschließend wird das physikochemische Verhalten durch eine Reaktion an der  $\alpha$ -Aminogruppe möglichst wirksam verändert. Polystyrol-2%Divinylbenzol-Copolymer ist als feste Phase für Peptidsynthesen den anderen erprobten Trägersubstanzen (76,77) überlegen. Das Material besteht aus langen

Alkylketten, die an jedem zweiten C-Atom einen Phenylring tragen und bei ungefähr jedem fünfzigsten C-Atom durch p-Diäthylphenylgruppen vernetzt sind (55). Dieser Aufbau macht das Merrifield-Harz unlöslich in den üblichen Lösungsmitteln und läßt es in einigen organischen Lösungsmitteln (z.B. Methylenchlorid, N,N-Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid) sehr stark quellen. Für chemische Reaktionen von großen Molekülen an diesem Harz ist ein hoher Quellungsgrad notwendig, da viele Bindungsstellen innerhalb der Poren der Polystyrolkugeln liegen. Die genannten Materialeigenschaften sowie die gute Löslichkeit von tRNS in N,N-Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid ließen Merrifield-Harz als geeignete Trägersubstanz erscheinen.

Wie aus Abb.1 hervorgeht, ist das Verfahren zur Peptidsynthese nach Merrifield in seiner Originalform für die Knüpfung einer Peptidbindung mit Lys1-tRNS<sup>Lys</sup> nicht geeignet, da die Peptide über das Carboxyl-Ende mit dem Harz verbunden sind und die Bindung der Aminosäure am 3'-OH des terminalen Nucleosids der tRNS ja ebenfalls über die Carboxylgruppe erfolgt. Es wurde deshalb als erste Aminosäure die N-geschützte Dicarbonsäure Glutamat mit einer ihrer Carboxylgruppen am Harz verestert (Abb.2). Obwohl im Prinzip beide Gruppen reagieren können, wurde angenommen, daß aufgrund der elektronenzie-

henden Wirkung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen und wegen der Anwesenheit von Triäthylamin der  $\alpha$ -Carboxylester gebildet wurde (78,79). Die Verwendung eines Nitrochloromethylpolymers, wie in Abb.1 dargestellt, war

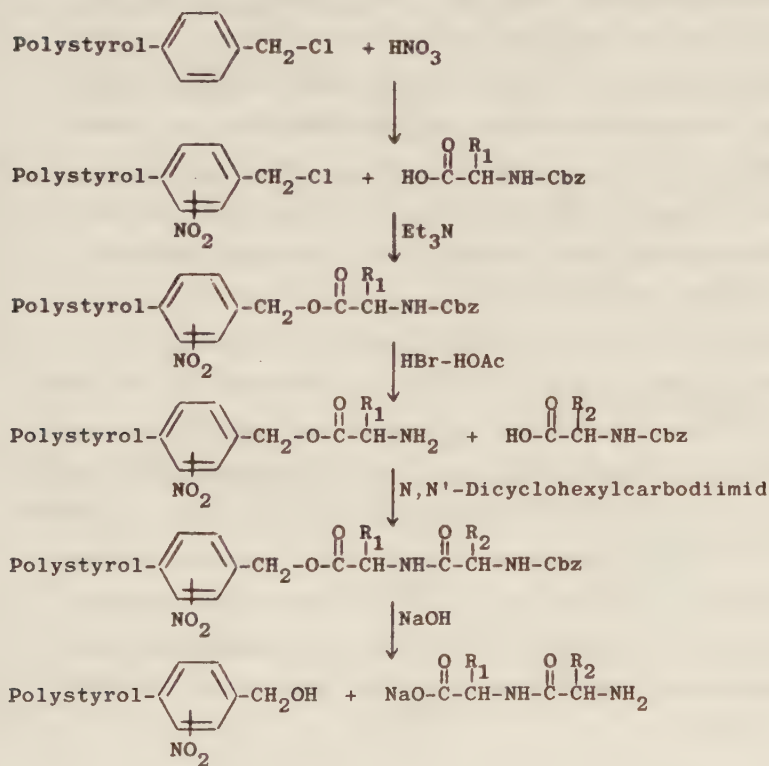


Abb.1 Schema der Peptidsynthese an fester Phase nach MERRIFIELD (53).

nicht notwendig, da der Nitobenzylester für die Kopp-  
lung der ersten Aminosäure an das Harz nur wegen sei-  
ner im Vergleich zum Benzylester höheren Stabilität  
während der Abspaltung der N-Schutzgruppen durch Hbr/  
Eisessig gewählt wurde (55). Abb.2 zeigt, daß auf ein  
Abspalten der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe verzichtet  
werden konnte. Die Einführung der Peptidbindung durch  
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, wie MERRIFIELD sie bevor-  
zugt, war nicht brauchbar, da diese Substanz auch mit  
Aminogruppen der heterozyklischen Stickstoffbasen der  
tRNS reagiert (80). Deshalb wurde der N-Hydroxysuccin-  
imidester der  $\omega$ -Carboxylfunktion des Carbobenzoxygluta-  
mats mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid hergestellt, um  
dann diesen aktiven Ester mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des tRNS-  
gebundenen Lysins reagieren zu lassen. N-Hydroxysuccin-  
imidester reagieren selektiv mit der  $\alpha$ -Aminogruppe (41).  
Von der auf diese Weise kovalent gebundenen Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>  
sollte durch ausgiebiges Waschen mit Dimethylsulfoxid/  
Na-Acetat, pH 5,0 (3:1, v/v) alle andere tRNS entfernt  
werden, um dann durch Hydrolyse der alkalilabilen Lysyl-  
tRNS-Esterbindung reine lysinspezifische tRNS zu erhal-  
ten (Abb.2).

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse von repräsentativen  
Versuchen zusammengestellt. In Vorversuchen wurde zu-  
erst die Synthese des Dipeptids Carbobenzoxyglutamyl-

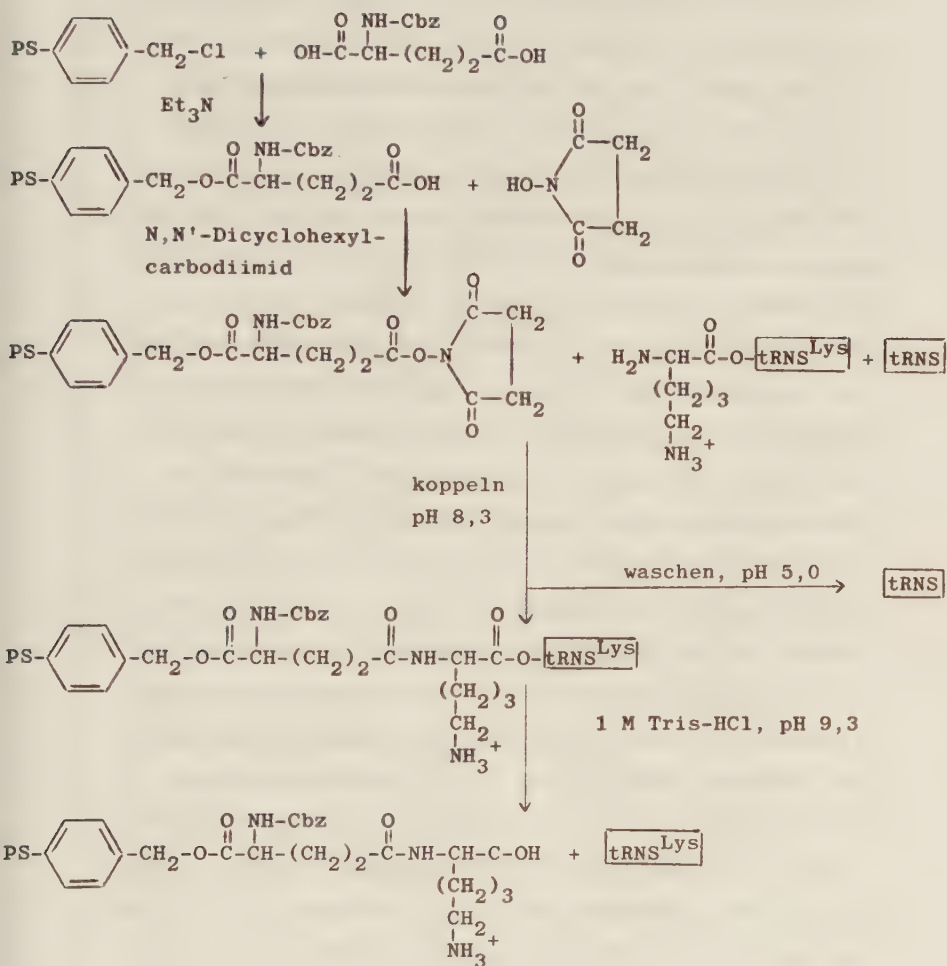


Abb.2 Schema der geplanten Reinigung von  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  durch  
 Kopplung von Lysyl- $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  an Merrifield-Harz.  
 PS- : Polystyrol-(2% Divinylbenzol)-Copolymer.

( $^{14}\text{C}$ -)lysin in Lösung erprobt. Ein Vergleich der bei pH 5,0 und pH 8,0 jeweils erreichten Ausbeuten zeigt, daß der nucleophile Angriff der aktivierten Carboxylfunktion aus die  $\alpha$ -Aminogruppe des Lysins nur erfolgreich ist, wenn die Aminogruppe nicht protoniert ist. Als nächstes wurde dann untersucht, ob die Synthese des Di-peptids auch mit dem an Merrifield-Harz gebundenen aktiven Ester im gleichen Puffer-Lösungsmittel-Gemisch gelingt. Die Anwesenheit von wässrigen Lösungsmitteln läßt das Styrolcopolymer schrumpfen und führt dazu, daß das Material an den Wänden des Reaktionsgefäßes haftet und nur schwer in Suspension zu halten ist. Andererseits mußten geringe Mengen Wasser eingesetzt werden, um in anschließenden Versuchen ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS in für präparative Nutzung ausreichenden Konzentrationen lösen zu können. Bei der Veresterung der ersten Aminosäure mit dem Chlormethyl-Styrolcopolymer wurde ein Wert erreicht (Tabelle 1), der im Bereich der von MERRIFIELD angegebenen optimalen Substitution von 0,5 mmol/g Harz liegt. Die Ausbeuten, die bei der Synthese des aktiven Esters und der Kopplung der zweiten Aminosäure erreicht wurden, sind niedrig, gemessen an den Anforderungen, die bei der Synthese größerer Peptide gestellt werden müssen. Sie zeigten aber, daß die Synthese des Dipeptids unter diesen ungünstigen Lösungsmittelbedingungen für die geplanten Versuche in ausreichenden Mengen möglich ist. Den-

Tabelle 1 Ergebnisse von Versuchen zur Kopplung von ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS Lys an Merrifield-Harz.

| Syntheseprodukt                                                          | Lösungsmittel                                         | Nachweis                                                     | Ausbeute             | Bemerkungen                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Carbobenzoxylglutamyl-<br>( $^{14}\text{C}$ -)lysin                      | Dimethylformamid<br>Triäthanolamin-<br>Puffer, pH 5,0 | Radioaktivität<br>nach Dünnschicht-<br>chromatographie       | 13 %                 | 100 % = Summe<br>der Radioaktivität<br>aller Flecken                                                           |
| Carbobenzoxylglutamyl-<br>( $^{14}\text{C}$ -)lysin                      | Dimethylformamid<br>Triäthanolamin-<br>Puffer, pH 8,0 | Radioaktivität<br>nach Dünnschicht-<br>chromatographie       | 79 %                 | 100 % = Summe<br>der Radioaktivität<br>aller Flecken                                                           |
| Carbobenzoxylglutamyl-<br>Styrolcopolymer                                | Äthylacetat/<br>Triäthylamin                          | Quantitative<br>Ninhydrinmethode                             | 0,53 mMol/<br>g Harz |                                                                                                                |
| N-Hydroxysuccinimid-<br>ester von Cbz-Gluta-<br>myl-Styrolcopolymer      | Dimethylsulfoxid                                      | Gewicht                                                      | 75 %                 | 100 % = 3,15 mMol<br>Menge des eingesetz-<br>ten Cbz-Glutamats                                                 |
| ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-Cbz-glu-<br>tamyl-Styrolcopoly-<br>mer         | Dimethylsulfoxid<br>Triäthanolamin-<br>Puffer, pH 8,0 | Radioaktivität<br>in den Waschlö-<br>sungen                  | 68 %                 | Differenz aus einge-<br>setzter Radioaktivi-<br>tät (=100 %) und der<br>in den Waschlösungen                   |
| ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS Lys-<br>Cbz-glutamyl-Styrol-<br>copolymer | Dimethylsulfoxid<br>Triäthanolamin-<br>Puffer, pH 8,0 | säurefällbare<br>Radioaktivität<br>in den Waschlö-<br>sungen | 0 %                  | Differenz aus einge-<br>setzter säurefällba-<br>rer Radioaktivität<br>(=100 %) und der in<br>den Waschlösungen |

noch wurde in den folgenden Versuchen, ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> an aktiviertes polymer-gebundenes Carbobenzoxylglutamat zu koppeln, in keinem Fall eine signifikante Menge kovalent gebundener Aminoacyl-tRNS beobachtet (Tabelle 1, letzte Zeile). Bereits beim Absaugen des Merrifield-Harzes nach Beendigung der Reaktion (siehe 2.2.1.8) wurden über 90 % der eingesetzten säurefällbaren Radioaktivität in dem abgesaugten Lösungsmittelgemisch wiedergefunden, während sich nur ungefähr 50 % des Gesamt-tRNS-Ausgangsmaterials in dieser Fraktion befanden. In den Waschlösungen nach Hydrolyse der Aminoacyl-tRNS-Esterbindung konnten dann der Rest der Radioaktivität als freies  $^{14}\text{C}$ -markiertes Lysin und ungefähr 30 % der Gesamt-tRNS nachgewiesen werden. Während in allen Fällen die eingesetzte Radioaktivität vollständig wiedergewonnen wurde, gingen immer größere Mengen (20-40 %) RNS durch unspezifische Bindung am Harz verloren. Extinktionsmessungen zur qualitativen und quantitativen Analyse der tRNS waren ungenau, da alle Lösungen nach der Inkubation mit Merrifield-Harz durch filterbare Fragmente des Styrolcopolymers, das ebenfalls UV-Licht absorbiert, verunreinigt waren.

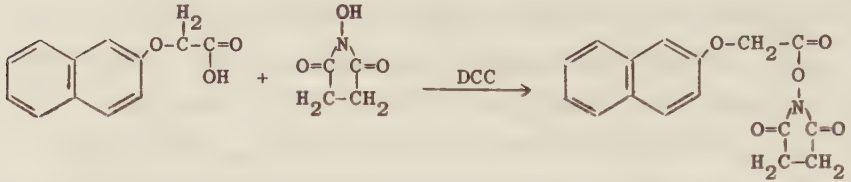
### 3.2 Ergebnisse der Versuche zur Reinigung von tRNS<sup>Lys</sup> durch Derivatisierung von Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>

Nachdem GILLAM et al. (60) die Chromatographie an BD-

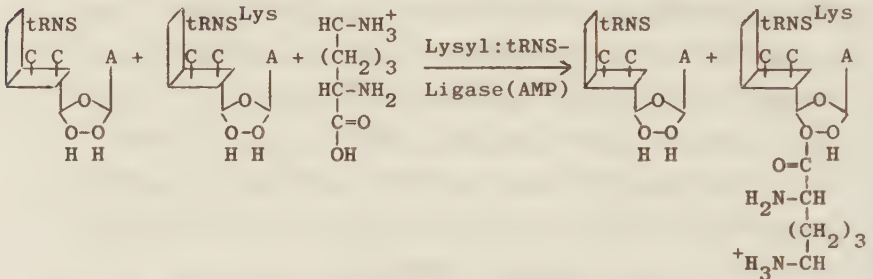
Cellulose als Methode zur Fraktionierung von tRNS eingeführt hatten, ergaben weitere Versuche dieser Gruppe, daß bei der Chromatographie von Aminoacyl-tRNS an BD-Cellulose alle tRNS-Arten, die mit Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan beladen worden waren, nur durch Elutionslösungen mit hoher Salzkonzentration und zusätzlich Äthanol desorbiert werden konnten. Es wurde erkannt, daß dieses im Vergleich mit der anderen tRNS extreme chromatographische Verhalten auf die Interaktion der aromatischen Gruppen dieser Aminosäuren mit den Benzoylresten des Chromatographie-Materials zurückzuführen ist. Dieses Prinzip wurde nun zu einem theoretischen Konzept erhoben und eine generell anwendbare Methode zu Abtrennung von Aminoacyl-tRNS von unbeladener tRNS entwickelt (42). Aromatische Derivate der jeweiligen Aminoacyl-tRNS werden durch die Reaktion eines entsprechenden aktiven Esters mit der  $\alpha$ -Aminogruppe der tRNS-gebundenen Aminosäure hergestellt und durch Chromatographie an BD-Cellulose von nicht aminoacylierter und folglich nicht derivatisierter tRNS abgetrennt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> mit dem 2-Naphthoxyacetylesther von N-hydroxysuccinimid derivatisiert (Abb.3), weil 2-Naphthoxyacetyl-lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> noch fester an BD-Cellulose "gebunden" wird als das entsprechende Derivat mit der von GILLAM et al. zuerst verwen-

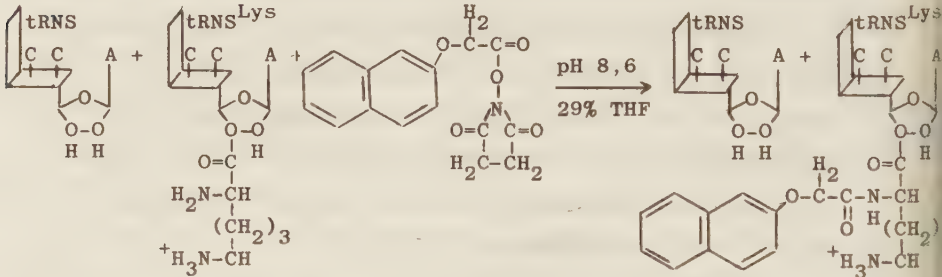
1. Synthese des 2-Naphthoxyacetyl-esters von N-Hydroxysuccinimid



2. Aminoacylierung von tRNS<sup>Lys</sup> mit (<sup>14</sup>C-)Lysin im Gesamt-tRNS-Gemisch



3. Synthese von 2-Naphthoxyacetyl-(<sup>14</sup>C-)lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>



4. Abtrennung der 2-Naphthoxyacetyl-(<sup>14</sup>C-)lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> von nicht derivatisierter tRNS durch Chromatographie an BD-Cellulose

5. Hydrolyse der 2-Naphthoxyacetyl-(<sup>14</sup>C-)lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Esterbindung

6. Fraktionierung von tRNS<sup>Lys</sup> durch Reversed-Phase-5-Chromatographie zu

Gewinnung der Einzelspecies tRNS<sub>I</sub><sup>Lys</sup>, tRNS<sub>II</sub><sup>Lys</sup>, tRNS<sub>III</sub><sup>Lys</sup> und tRNS<sub>IV</sub><sup>Lys</sup>

Abb.3 Schema zur Reinigung von tRNS<sup>Lys</sup> durch Derivatisierung von (<sup>14</sup>C-)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>.

THF: Tetrahydrofuran, DCC: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid

deten Phenoxyessigsäure. Wegen der geringen Löslichkeit des aktiven Esters der 2-Naphthoxyessigsäure war es allerdings notwendig, in Vorversuchen die optimalen Bedingungen für die Derivatisierungsreaktion zu ermitteln. Es wurde schon erwähnt (3.1), daß der aktive Ester nur mit einer nicht protonierten  $\alpha$ -Aminogruppe reagieren kann, und es ist deshalb naheliegend, den pH des Reaktionsgemisches in die Nähe des pK der  $\alpha$ -Aminogruppe zu legen. Wegen der Alkalilabilität der Aminoacyl-tRNS-Esterbindung mußte aber ein Kompromiß zwischen möglichst hoher Reaktionsausbeute und möglichst geringer Hydrolyse des Lysyl-tRNS-Esters gefunden werden (der pK der  $\alpha$ -Aminogruppe von Lysin ist 9,12 (78)). Um die Löslichkeit des 2-Naphthoxyacetylesters von N-Hydroxysuccinimid im wässrigen Reaktionsansatz zu verbessern, wurden möglichst hohe Tetrahydrofuran-Konzentrationen angestrebt. Auch dem sind Grenzen gesetzt, da bei hohen Konzentrationen des organischen Lösungsmittels die dreidimensionale Struktur der tRNS zunehmend entfaltet wird und dadurch weitere Aminogruppen der heterozyklischen Stickstoffbasen der Reaktion mit dem aktiven Ester zugänglich gemacht werden. Außerdem beginnt die tRNS bei Tetrahydrofuran-Konzentrationen über 35 % zu präzipitieren. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse dieser Vorversuche zusammengefaßt. Wegen des experimentellen Aufwandes dieser Versuche mußten beide Parameter, pH und Tetra-

Tabelle 2 Derivatisierung von ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> in Abhängigkeit von pH und Tetrahydrofuran-Konzentration.

| Tetrahydrofuran-Konzentration<br>(%) | pH  | Lysyl-tRNS <sup>Lys</sup><br>derivatisiert<br>(%)* | Hydrolyse der<br>Lysyl-tRNS <sup>Lys</sup><br>Esterbindung<br>(%) |
|--------------------------------------|-----|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 5,0                                  | 7,3 | 21                                                 | 0                                                                 |
| 5,2                                  | 8,0 | 56                                                 | 0                                                                 |
| 6,95                                 | 8,6 | 68                                                 | 1                                                                 |
| 22,7                                 | 9,0 | 78                                                 | 5,5                                                               |
| 28,6                                 | 8,6 | 93                                                 | 1                                                                 |

Experimentelle Bedingungen sind unter 2.2.2.4 beschrieben.

\* pMol ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>, die mit 1 M NaCl/20% Äthanol eluiert wurden, in % der pMol ( $^{14}\text{C}$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>, die insgesamt von der Säule wiedergewonnen wurden.

hydrofuran-Konzentration, gleichzeitig verändert werden.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß pH 8,6 und eine Tetrahydrofuran-Konzentration von 29 % geeignete Reaktionsbedingungen darstellen.

Für die Reinigung der lysinspezifischen tRNS-Species wurden 613 mg Gesamt-tRNS aus 4000 g Gewebe von 2000 13 Tage alten Hühnerembryonen isoliert. 100 mg tRNS wurden für analytische Zwecke und als Referenzmaterial in späteren Versuchen aufbewahrt. Als Ausgangsmaterial wur-

den 513 mg (11300  $E_{260nm}$ -Einheiten) mit einer spezifischen Lysin-Akzeptorkapazität von 87 pMol/ $E_{260nm}$ -Einheit eingesetzt.

Von diesen 513 mg Gesamt-tRNS mußte zuerst die phenylalaninspezifische tRNS abgetrennt werden, da tRNS aus dem Cytoplasma von Eukaryonten mit dieser Aminosäurespezifität aufgrund einer hydrophoben, fluoreszierenden Base im Anticodonbereich so stark an BD-Cellulose adsorbiert, daß sie in den meisten Fällen nur durch hochkonzentrierte Salzlösungen, denen Äthanol zugesetzt ist, eluiert werden kann (35-38). tRNS<sup>Phe</sup> würde also, wäre sie nicht vorher aus dem tRNS-Gemisch entfernt worden, die derivatisierte Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> verunreinigen, die unter ähnlichen Bedingungen eluiert wird. Das tRNS-Ausgangsmaterial wurde an BD-Cellulose adsorbiert und schrittweise mit 0,8 M NaCl, 1,0 M NaCl und 1,0 M NaCl/10% Äthanol eluiert (Säule Nr.1 in Tabelle 3 und Abb.4). Entgegen den Erwartungen wurde die phenylalaninspezifische tRNS schon mit 1,0 M NaCl desorbiert, wie es ähnlich nur für tRNS<sup>Phe</sup> aus dem Cytoplasma von Euglena gezeigt werden konnte (33). In den vereinigten tRNS<sup>Phe</sup> enthaltenden Fraktionen (Pool 1b in Abb.4) wurde auch noch etwas Lysin-Akzeptorkapazität gefunden (123 pMol/ $E_{260nm}$ -Einheit). Deshalb wurde Pool 1b nochmals an einer BD-Cellulose-Säule fraktioniert (Nr.2 in Abb.4 und



Tabelle 3 Experimentelle Bedingungen der Chromatographie-Schritte zur Isolierung und Reinigung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species.

| Säule |                                                           |                                               | Tempe-<br>ratur<br>(°C) | Puf-<br>fer | Äquili-<br>brierung<br>(M NaCl) | Durch-<br>flußg.<br>(ml/min) | Elution                |                                                                      |       |                 |
|-------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|-------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------|-----------------|
| Nr.   | Größe<br>(cm)                                             | Art                                           |                         |             |                                 |                              | Gradienten-<br>form    | NaCl-Konzentration<br>(M)                                            | (v/v) | Volumen<br>(ml) |
| 1     | 4x35                                                      | BD-<br>Cellulose                              | 23                      | A           | 0,3                             | 5                            | diskonti-<br>nuierlich | 0,8<br>1,0<br>1,0/10% Äthanol                                        |       |                 |
| 2     | 2x80                                                      | BD-<br>Cellulose                              | 23                      | A           | 0,6                             | 3                            | kontinu-<br>ierlich    | 0,8 bis 1,0                                                          |       | 1000            |
| 3     | 4x35                                                      | BD-<br>Cellulose                              | 23                      | B           | 0,3                             | 5                            | diskonti-<br>nuierlich | 1,0<br>1,0/5% Äthanol<br>1,0/20% Äthanol<br>2,0/20% 2-Methoxyäthanol |       |                 |
| 4     | 2x15                                                      | BD-<br>Cellulose                              | 23                      | B           | 0,3                             | 5                            | diskonti-<br>nuierlich | 1,0<br>2,0/20% 2-Methoxyäthanol                                      |       |                 |
| 5     | zwei<br>0,6x140<br>hinter-<br>einander<br>geschal-<br>tet | Reversed-<br>Phase-S-<br>Chromato-<br>graphie | 32                      | C           | 0,4                             | 0,5                          | konti-<br>nuierlich    | 0,4 bis 0,6<br>0,6 bis 1,0                                           |       | 400<br>500      |

Pufferlösungen: A: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Essigsäure, pH 5,0; B: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Essigsäure, pH 4,5; C: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-Mercaptoäthanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0.  
Die Nummern der Säulen entsprechen denen der Abb.4.

Tabelle 3). Durch Eluieren mit einem linearen Salzgradienten wurden 92  $E_{260nm}$ -Einheiten hochangereicherter phenylalninspezifischer tRNS (Pool 2b) von der übrigen tRNS mit einiger Lysin-Akzeptorkapazität (Pool 2a) abgetrennt. Wie weiter aus Abb.4 hervorgeht, wurden jetzt Pool 2a und Pool 1a vereinigt und mit ( $^{14}C$ -)Lysin aminoacyliert. Auch unter diesen präparativen Beladungsbedingungen wurde eine spezifische Lysin-Akzeptorkapazität von 87 pMol/ $E_{260nm}$ -Einheit erreicht. Bei der nachfolgenden Phenolextraktion zur Entfernung des Proteins wurden fast 30 % der säurefällbaren Radioaktivität verloren. Verluste dieser Größenordnung waren auch in Kontrollversuchen, in denen das Protein durch DEAE-Cellulose-Chromatographie oder durch Phenolextraktion in Anwesenheit von  $NaClO_4$ , Chloroform und Isoamylalkohol abgetrennt wurde, nicht zu vermeiden. Die Derivatisierung mit dem 2-Naphthoxyacetylerster von N-Hydroxysuccinimid wurde dann unter den vorher ermittelten Reaktionsbedingungen durchgeführt und das Gemisch aus unbeladener tRNS und 2-Naphthoxyacetyl-( $^{14}C$ -)lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> an BD-Cellulose adsorbiert (Säule Nr.3 in Abb.4 und Tabelle3). Die Hauptmenge der tRNS wurde mit 1,0 M NaCl eluiert (Pool 3a). In dieser Fraktion wurden weniger als 3 % der auf die Säule gegebenen Radioaktivität eluiert, was eine hohe Effektivität der Derivatisierungsreaktion anzeigte. Die derivatisierte ( $^{14}C$ -)Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> wurde

dann schrittweise mit 1,0 M NaCl/5% Äthanol (Pool 3b), 1,0 M NaCl/20% Äthanol (Pool 3c) und 2,0 M NaCl/20% 2-Methoxyäthanol (Pool 3d) desorbiert. Diese drei Fraktionen wurden vereinigt und der 2-Naphthoxyacetyl-lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Ester hydrolysiert. Extinktionsmessungen und Bestimmung der Lysin-Akzeptorkapazität ergaben eine Ausbeute von 180 E<sub>260nm</sub>-Einheiten mit einer spezifischen Lysin-Akzeptorkapazität von 820 pMol/E<sub>260nm</sub>-Einheit.

### 3.3 Ergebnisse der Versuche zur Reinigung der lysinspezifischen tRNS-Einzelspecies

In Abb.5a ist die Fraktionierung von 83 E<sub>260nm</sub>-Einheiten des tRNS-Ausgangsmaterials durch Reversed-Phase-5-Chromatographie an zwei hintereinandergeschalteten Säulen (jede 0,6x140 cm) dargestellt. Die Bestimmung der Lysin-Akzeptorkapazität in jeder eluierten Fraktion identifizierte vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species, die nach der Reihenfolge ihrer Elution benannt wurden. tRNS<sup>Lys</sup><sub>I</sub> mit dem kleinsten Anteil (540 pMole) wurde nicht vollständig von der mit 2600 pMolen am meisten vorhandenen Species tRNS<sup>Lys</sup><sub>II</sub> abgetrennt, während tRNS<sup>Lys</sup><sub>III</sub> (730 pMole) und die 1590 pMole repräsentierende tRNS<sup>Lys</sup><sub>IV</sub> durch dieses Chromatographieverfahren vollständig separiert wurden.

Die 180 E<sub>260nm</sub>-Einheiten des gereinigten Gemisches der tRNS<sup>Lys</sup>-Einzelspecies wurden unter identischen Bedin-

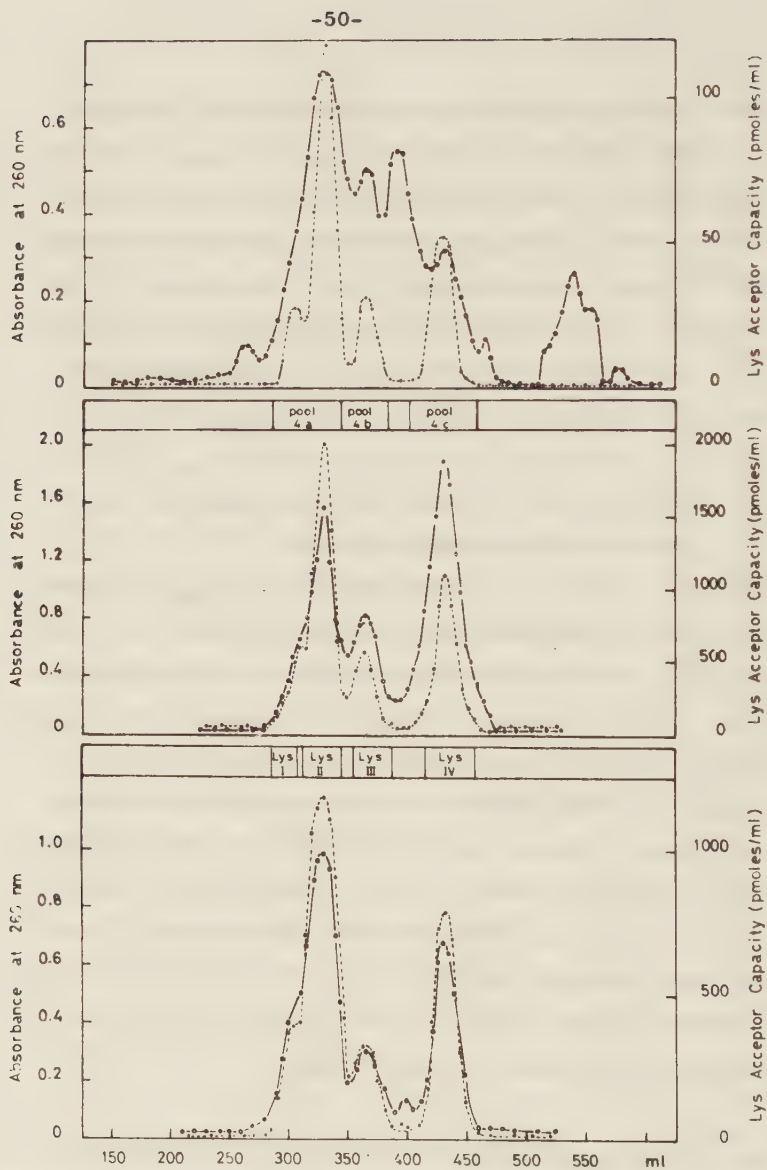


Abb.5a-c Verteilung der lysinakzeptierenden tRNA-Species nach Reversed-Phase-5-Chromatographie. a) Gesamt-tRNA,

Forts. Legende Abb.5a-c

Ausgangsmaterial; b)  $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$  nach dem ersten Reinigungszyklus; c)  $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$  nach dem zweiten Reinigungszyklus.

(—○—○—)  $E_{260\text{nm}}$ ; (---●---●---) Lysin-Akzeptorkapazität.

Ein Reinigungszyklus umfaßt die Derivatisierung der aminoacylierten  $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ , ihre Abtrennung von nicht derivatisierter  $\text{tRNS}$  und Hydrolyse der 2-Naphthoxyacetyl-lysyl- $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ -Esterbindung.

---

ungen chromatographiert (Säule Nr.5 in Abb.4 und Tabelle 3). Die Darstellung in Abb.5b zeigt, daß die Verteilung des UV-absorbierenden Materials mit den Positionen der vier  $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ -Species in Abb.5a übereinstimmt.

Obwohl der Verlauf der Lysin-Akzeptorkapazität in Abb.5b mit dem Extinktionsverlauf zusammenfällt, weisen die relativ niedrigen spezifischen Akzeptorkapazitäten von  $\text{tRNS}_{\text{III}}^{\text{Lys}}$  (704 pMol/ $E_{260\text{nm}}$ -Einheit) und  $\text{tRNS}_{\text{IV}}^{\text{Lys}}$  (440 pMol/ $E_{260\text{nm}}$ -Einheit) darauf hin, daß sich während der Reinigungsprozedur unspezifisches UV-absorbierendes Material angesammelt hat und jetzt diese Species verunreinigt.

Die Fraktionen mit den beiden Species  $\text{tRNS}_{\text{III}}^{\text{Lys}}$  (Pool 4b) und  $\text{tRNS}_{\text{IV}}^{\text{Lys}}$  (Pool 4c) wurden deshalb wieder vereinigt und noch einmal dem Beladungs- und Derivatisierungsverfahren unterworfen. An einer kleinen BD-Cellulose-Säule (Säule Nr.4 in Abb.4 und Tabelle 3) konnten dann

45  $E_{260\text{nm}}$ -Einheiten  $\text{tRNS}$  mit einer spezifischen Lysin-Akzeptorkapazität von 1045 pMol/ $E_{260\text{nm}}$ -Einheit von dem restlichen Material abgetrennt werden. Nach Hydrolyse

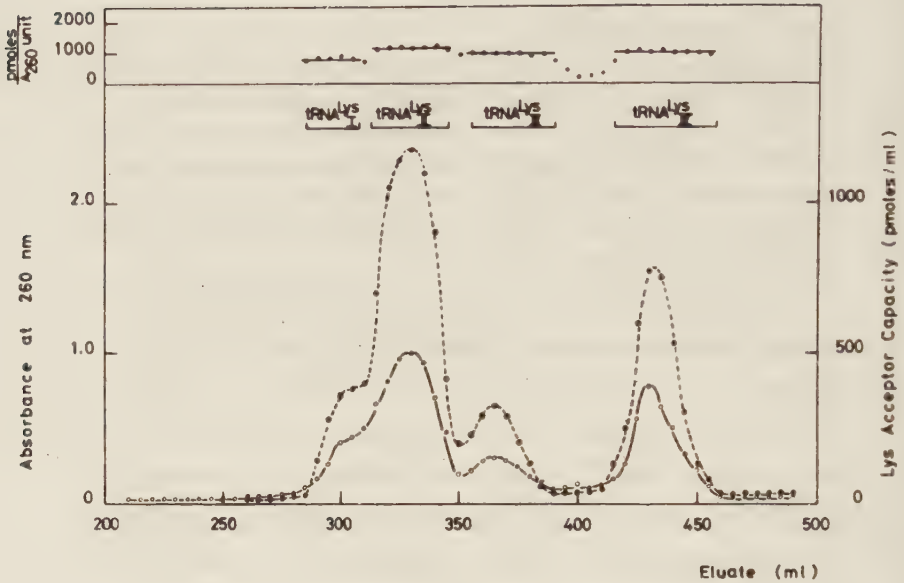


Abb.5d Verteilung der vier gereinigten  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -Species nach Reversed-Phase-5-Chromatographie.

Darstellung von Abb.5c in anderem Maßstab zusammen mit dem Verlauf der spezifischen Lysin-Akzeptorkapazität ( $\text{pMol}/\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheit).

der Aminoacyl-tRNA-Esterbindung wurde diese  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  mit Pool 4a, der aus den bereits hochgereinigten Species  $\text{tRNA}_\text{I}^{\text{Lys}}$  und  $\text{tRNA}_\text{II}^{\text{Lys}}$  bestand, vereinigt und durch Reversed-Phase-5- Chromatographie fraktioniert (Abb.5c). Die eluierten Fraktionen der jeweiligen  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -Species wurden, wie in Abb.5d angegeben, vereinigt. Es wurden nur Frak-

tionen aus Bereichen mit konstanter spezifischer Akzeptorkapazität verwendet. Die Lösungen der vier  $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ -Species wurden durch Lyophilisierung konzentriert und dann ausgiebig gegen Wasser dialysiert. Die jeweiligen Ausbeuten und spezifischen Lysin-Akzeptorkapazitäten der vier hochgereinigten  $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ -Einzelspecies sind in Abb.4 nebeneinander dargestellt. Darus ist zu ersehen, daß die spezifische Akzeptorkapazität von  $\text{tRNS}_{\text{II}}^{\text{Lys}}$ ,  $\text{tRNS}_{\text{III}}^{\text{Lys}}$  und  $\text{tRNS}_{\text{IV}}^{\text{Lys}}$  den für hochgereinigte tRNS zu erwartenden "theoretischen" Werten nahekommt, während die Lysin-Akzeptorkapazität von  $\text{tRNS}_{\text{I}}^{\text{Lys}}$  geringer ist. Dies kann auf eine geringe Kontamination mit unspezifischem, UV-absorbierendem Material zurückzuführen sein, die unter der verhältnismäßig kleinen Menge an  $\text{tRNS}_{\text{I}}^{\text{Lys}}$  stärker ins Gewicht fällt.

### 3.4 Ergebnisse der Versuche zur Charakterisierung der vier gereinigten $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ -Einzelspecies

#### 3.4.1 Spaltung mit Ribonuclease- $\text{T}_1$

Ribonuclease- $\text{T}_1$  spaltet die Internucleotid-Bindungen zwischen dem 3'-Phosphat eines Guaninnucleotids und der 5'-Hydroxylgruppe des folgenden Nucleotids und setzt dadurch Guanosin-2',3'-Monophosphate oder Oligonucleotide mit diesem Nucleotid am 3'-Ende frei. Das Enzym spaltet diese Bindung nicht, wenn an Stelle von Guanin 7-Methylguanin oder 6-Thioguanin die Basenkomponente des

Nucleotids bilden; entsprechende Bindungen mit 1-Methylguanin oder N(2)-Dimethylguanin als Basen werden nur sehr langsam hydrolysiert(81). Die vollständige Spaltung aller durch RNase-T<sub>1</sub> angreifbaren Bindungen eines tRNS-Moleküls und die darauffolgende zweidimensionale Auftrennung des entstandenen Gemisches aus vorwiegend Di-, Tri- und Tetranucleotiden durch Ionophorese auf Cellulose-Acetats-Sreifen und DEAE-Papier (82) ergibt für die untersuchte tRNS-Species einen spezifischen "Finger-print", der nur von der Basensequenz dieser Species abhängig ist. Demgegenüber wird bei einer partiellen Spaltung einer tRNS durch RNase-T<sub>1</sub> zwischen bestimmten Guanin-Positionen bevorzugt gespalten. Dadurch entstehen durch Aufbrechen der leicht zugänglichen Guanin-Positionen zunächst große Oligonucleotide, die dann weiter abgebaut werden. Diese unterschiedliche Spaltbarkeit der RNase-T<sub>1</sub>-sensitiven Internucleotid-Bindungen ist hauptsächlich von der individuellen dreidimensionalen Faltung der jeweiligen tRNS-Art abhängig. Die bei partieller Spaltung entstehenden größeren Oligonucleotide werden üblicherweise durch Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose oder durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese (jeweils in Gegenwart hoher Konzentrationen an Harnstoff) analysiert (63,83).

Die vier gereinigten tRNS<sup>Lys</sup>-Species wurden jeweils iden-

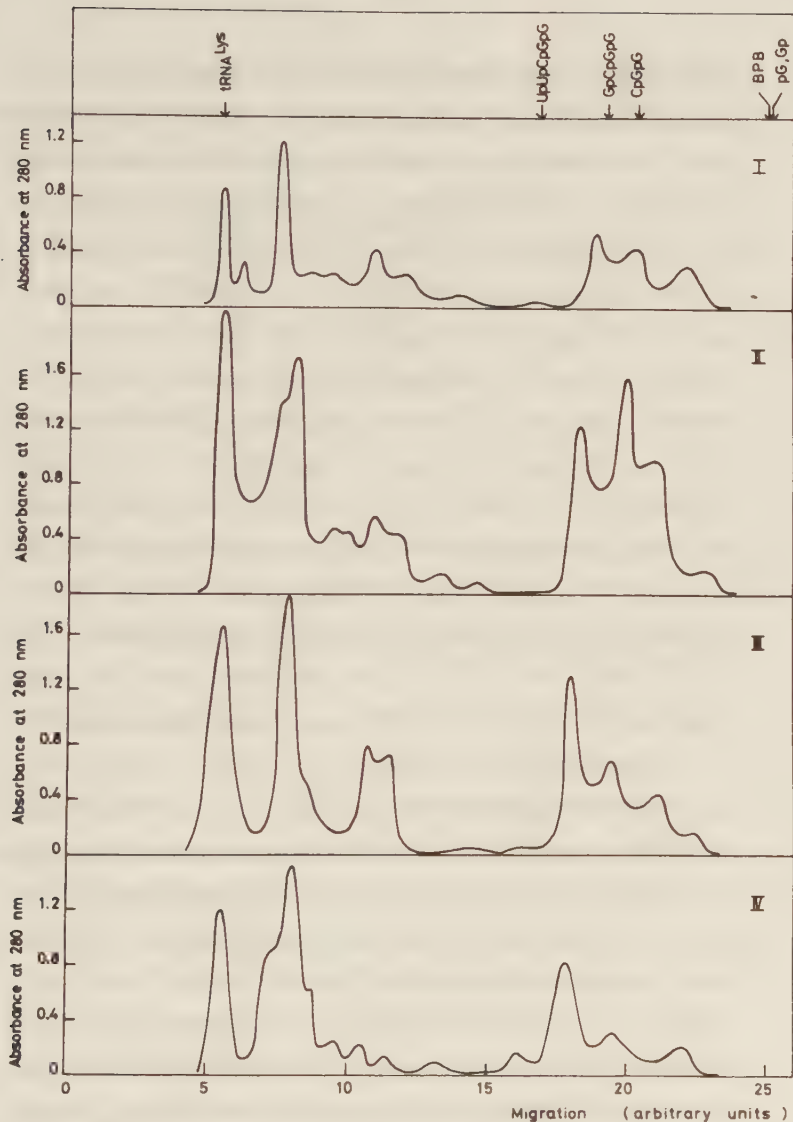


Abb.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese in 7 M Harnstoff der Oligonucleotide nach RNase-T<sub>1</sub>-Spaltung von tRNS<sup>Lys</sup><sub>I</sub> (I), tRNS<sup>Lys</sup><sub>II</sub> (II), tRNS<sup>Lys</sup><sub>III</sub> (III), tRNS<sup>Lys</sup><sub>IV</sub> (IV). Im oberen Bildrand ist die Wanderung von Oligonucleotiden bekannter Sequenz gekennzeichnet; BPB: Bromphenolblau.

tisch unter Bedingungen für eine derartige partielle Spaltung inkubiert. Das jeweilige Oligonucleotid-Gemisch wurde durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Abb.6 zeigt die entsprechenden Extinktionsverteilungsmuster der Oligonucleotide, die in wiederholten Experimenten reproduzierbar waren. Die vier tRNA<sup>Lys</sup>-Species sind sowohl in der Position als auch im quantitativen Verhältnis ihrer großen Oligonucleotide deutlich verschieden, und auch im Bereich der kleinen Oligonucleotide ist eine für jede Species individuelle Verteilung erkennbar. Die im oberen Rand der Abbildung angegebenen Positionen von Referenz-Oligonucleotiden zeigen nur ungefähr die Größe der RNase-T<sub>1</sub>-Spaltprodukte, da diesen Referenzsubstanzen das 3'-terminale Phosphat fehlt.

#### 3.4.2 Gleichgewichtsdialyse gegen Lysin-Codons enthaltende Tetranucleotide

Für hochgereinigte tRNA-Arten läßt sich die Frage nach ihrer Codon-Spezifität durch Gleichgewichtsdialyse gegen die entsprechenden Codon-Trinucleosiddiphosphate direkt beantworten. Da die mit solchen Codon-Triplets beobachteten Assoziationskonstanten relativ niedrig sind (84), wurden für die hier zu beschreibenden Experimente Tetranucleosidtriphosphate benutzt, um die komplementäre Assoziation mit dem Anticodon-Abschnitt der tRNA zu stabilisieren und damit ihre Aussagekraft zu erhöhen. In

Tabelle 4 Assoziationskonstanten der Lysin-Codons enthaltenden Tetramere gegenüber den vier  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -Species.

| $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -<br>Species | $K_{\text{obs}}^{\text{ass}} [\text{M}^{-1}]$ |      |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|------|
|                                         | AAGA                                          | AAAA |
| I                                       | 5650                                          | 0    |
| II                                      | 23000                                         | 0    |
| III                                     | 500                                           | 5580 |
| IV                                      | 0                                             | 5110 |

allen bisher bekannten  $\text{tRNA}$ -Primärsequenzen ist die am 5'-Ende des Anticodons benachbarte Base ein Uracil. Deshalb wurden die beiden Lysin-Codon-Triplets ApApG und ApApA um einen Adenylatrest (mit  $^{14}\text{C}$ -markierter Base) verlängert. Jede der vier  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -Species wurde gegen jedes dieser beiden Tetramere in getrennten Versuchen dialysiert. Die beobachteten Assoziationskonstanten (Tabelle 4) zeigen deutlich, daß  $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Lys}}$  und  $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Lys}}$  selektiv durch das Triplet AAG codiert werden, während  $\text{tRNA}_{\text{III}}^{\text{Lys}}$  und  $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Lys}}$  nur das Codon-Triplet AAA binden.

### 3.4.3 Poly(A)-gesteuerte Polylysinsynthese

Es galt als nächstes die Frage zu beantworten, ob das selektive Bindungsverhalten der vier  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -Species gegenüber den beiden Lysin-Codons auch unter den Bedin-

Tabelle 5 Polylysinsynthese in einem von Poly(A) gesteuerten ribosomalen System.

|                                                                                                                                                    | cpm  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Vollständiges System mit 10 Ci/Mol ( $^{14}\text{C}$ -)Lysin<br>(mit einer für Lysin:tRNS-Ligase(AMP) angereicherten Fraktion aus Hühnerembryonen) |      |
| + Gesamt-tRNS aus Hühnerembryonen:                                                                                                                 |      |
| 4,8 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten                                                                                                           | 6870 |
| 2,8 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten                                                                                                           | 5690 |
| 1,2 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten                                                                                                           | 3580 |
| - tRNS                                                                                                                                             | 570  |
| - Lysin:tRNS-Ligase(AMP)-Fraktion (in Gegenwart von 2,4 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten tRNS)                                                 | 340  |
| Vollständiges System mit 25 Ci/Mol ( $^{14}\text{C}$ -)Lysin                                                                                       |      |
| + tRNS <sup>Lys</sup> 0,57 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten Species I                                                                          | 1060 |
| 0,61 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten Species II                                                                                               | 1320 |
| 0,35 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten Species III                                                                                              | 2740 |
| 0,72 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten Species IV                                                                                               | 7630 |
| - tRNS                                                                                                                                             | 1300 |

gungen der Translation von Poly(A) in einem Ribosomensystem nachzuweisen ist. Hierzu wurde ein von Poly(A) gesteuertes ribosomales System aus E.coli eingesetzt, das von der jeweils eingesetzten tRNS-Species aus Hühnerembryonen abhängig war. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Nach Subtrak-

tion der nicht von Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> abhängigen Hintergrund-Radioaktivität ist ersichtlich, daß nur tRNS<sup>Lys</sup><sub>III</sub> und tRNS<sup>Lys</sup><sub>IV</sub> die von Poly(A) gesteuerte Polylysinsynthese stimulieren. Der entsprechende Gegenversuch konnte nicht durchgeführt werden, da Poly(AAG) nicht erhältlich ist.

3.4.4 Hydrolysekinetik der Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Esterbindungen  
Es gibt aufgrund der tRNS-Strukturforschung (Röntgenbeugungsspektren, Modifikationsreaktionen, Oligonucleotid-Bindungsstudien) sowie aufgrund funktioneller Untersuchungen (7,66,85,86,87) viele sichere Hinweise dafür, daß das Aminosäure-Akzeptorende aus der relativ kompakten dreidimensionalen tRNS-Struktur herausragt und die Aminoacyl-tRNS-Esterbindung deshalb für chemische Reaktionen leicht zugänglich ist. Trotzdem ist anzunehmen, daß durch die unmittelbare Nähe des makromolekularen Ladungsträgers tRNS die Stabilität dieser Bindung von den spezifischen Einflüssen des individuellen Oberflächen-Ladungsmusters einer tRNS-Species abhängig ist (57, 88). Die vergleichende Untersuchung der Hydrolysekinetik der vier gereinigten tRNS<sup>Lys</sup>-Species wurde nach der von SARIN und ZAMECNIK beschriebenen Methode (57) der schnellen nucleophilen Katalyse unter strenger Einhaltung identischer Bedingungen durchgeführt. Während der präparativen Aminoacylierung akkumulierte Verunreinigungen einzelner Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Proben hätten unter den

Bedingungen der schnellen Esterspaltungskatalyse durch hochkonzentrierte Tris-Hydroxylgruppen keine Auswirkung auf die Reaktionskinetik. Die Hydrolyse der Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Esterbindungen aller vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species lief dann auch unter den angegebenen Versuchsbedingungen als eine, wie zu erwarten, Reaktion erster Ordnung ab, so daß die Katalyse der Esterspaltung durch nucleophilen Angriff als allein gemessener Effekt in diesen Experimenten angenommen werden durfte. Die Halbwertszeiten der jeweiligen Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Esterbindung sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Obwohl die beobachteten Unterschiede aufgrund der schnellen Hydrolyse gering sind, können sie als signifikant gewertet werden, da in wiederholten unabhängigen Experimenten die Regressionsgeraden der Hydrolysekinetik einer Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Species niemals mit der einer anderen Species interferierten.

#### 3.4.5 Sedimentationskoeffizienten und Molekulargewichte

In der bisherigen physikochemischen Charakterisierung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species konnte nicht festgestellt werden, ob die gemessenen Größen nur durch unterschiedliche sterische Konformation oder durch quantitative Unterschiede in der Primärstruktur verursacht wurden. Solche Unterschiede müßten sich im Molekulargewicht ausdrücken. Im Fall von tRNS und anderen Nucleinsäuren mit stabiler Konformation besteht zwischen Sedimentationskoeffizient

Tabelle 6 Charakteristische Daten der vier  $\text{trNS}^{\text{Lys}}$ -Species aus Analysen der Halbwertszeiten der Aminoacyl-trNS-Esterbindung, der Sedimentation und des Schmelzverhaltens.

| $\text{trNS}^{\text{Lys}}$ -<br>Species | Halbwertszeiten<br>der Lysyl-trNS <sup>Lys</sup> -<br>Esterbindung<br>(min) | Sedimentationsanalyse   |                     |            |       | Schmelzverhalten        |                               |             |                                                  |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|------------|-------|-------------------------|-------------------------------|-------------|--------------------------------------------------|
|                                         |                                                                             | Anzahl<br>der<br>Exper. | $s_{20,w}^0$<br>(S) | $s_{20}^0$ | MW    | Anzahl<br>der<br>Exper. | $T_m$<br>(Mittelwert)<br>(°C) | $s_{T_m}^0$ | $\Delta H^0$<br>$\frac{\text{kcal}}{\text{Mol}}$ |
| I                                       | 4,95<br>4,90                                                                | 5                       | 3,85                | 0,012      | 26060 | 4                       | 76,75                         | 0,05        | -136                                             |
| II                                      | 5,05<br>5,04                                                                | 3                       | 4,05                | 0,006      | 28120 | 5                       | 76,5                          | 0,07        | -142                                             |
| III                                     | 4,81                                                                        | 5                       | 3,94                | 0,009      | 27090 | 5                       | 77,8                          | 0,12        | -127                                             |
| IV                                      | 4,72                                                                        | 4                       | 3,89                | 0,004      | 26470 | 5                       | 77,1                          | 0,21        | -127                                             |

$s_{20}^0$  und  $s_{T_m}^0$  sind die entsprechenden Standardabweichungen der Mittelwerte, die anderen Symbole sind im Text erklärt.

und Molekulargewicht eine überschaubare Abhängigkeit, die durch die Scheraga-Mandelkern-Gleichung (89) beschrieben wird:  $M^{2/3} = (s_{20}^0, w [\eta]^{1/3} \eta_o^N) / \beta (1 - \bar{v} \rho)$ . Durch Arbeiten der Gruppen von FRESCO (75) wurde gezeigt, daß durch kleinere Unterschiede in der Konformation die Werte für  $\beta$ ,  $\eta$  und  $\bar{v}$  keine signifikante Änderung erfahren, wenn ausschließlich native tRNS-Moleküle unter Bedingungen, die deren dreidimensionale Struktur stabil halten, untersucht werden. Unterschiedliche standardisierte Sedimentationskoeffizienten repräsentieren dann Unterschiede im Molekulargewicht der tRNS-Moleküle. Wegen der alleinigen Abhängigkeit der Molekulargewichtsdaten von den jeweiligen Sedimentationskoeffizienten und der zu erwartenden geringen Unterschiede zwischen den einzelnen tRNS<sup>Lys</sup>-Species wurde in Vorversuchen die Technik der Hochgeschwindigkeits-Sedimentationsanalyse von tRNS so lange trainiert, bis die Standardabweichung der Mittelwerte aus Daten wiederholter Versuche im Mittel unter 0,5 % lag. Dann wurden die entsprechenden Bestimmungen mit den vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species durchgeführt. In Tabelle 6 sind die Mittelwerte der standardisierten Sedimentationskoeffizienten aus 3 bis 5 Experimenten unter identischen Bedingungen aufgeführt. Die für derartige Versuchsdaten extrem geringe Standardabweichung der Mittelwerte beweist die Signifikanz der geringen Unterschiede im Sedimentationsverhalten der untersuch-

ten tRNS-Species. Die Berechnung von Molekulargewichten aus diesen Daten (siehe Tabelle 6) ergibt einen Unterschied von 6 Nucleotiden zwischen der Species mit dem höchsten Molekulargewicht,  $\text{tRNS}_{\text{II}}^{\text{Lys}}$ , und der mit dem kleinsten,  $\text{tRNS}_{\text{I}}^{\text{Lys}}$ , wenn man eine durchschnittliche Anzahl von 77 Nucleotiden pro tRNS-Molekül und ein durchschnittliches Molekulargewicht von 350 für ein Nucleotid annimmt.

#### 3.4.6 Temperaturabhängige Extinktionstransition

Die Analyse des Schmelzverhaltens von tRNS ermöglicht einen Einblick in Unterschiede der Primärstruktur, die zur Ausprägung einer individuellen Konformation einer tRNS-Einzelspecies beitragen. Charakteristische Werte für den temperaturabhängigen Übergang aus dem durch Wasserstoffbrücken vermittelten gefalteten in den entfalteten Zustand sind der Mittelpunkt  $T_m$  der Extinktionstransition, durch die dieser Konformationsübergang sichtbar gemacht wird, und die Wärmetönung  $\Delta H^\circ$  des Konformationsüberganges, die unter der thermodynamischen Modellvorstellung eines "Alles-Oder-Nichts"-Überganges nach der Van't Hoff-Gleichung berechnet werden kann (siehe 2.2.3.7). Während der  $T_m$ -Wert in erster Linie von der qualitativen Basenzusammensetzung und dem Ionenmilieu der Lösung abhängig ist, stellt die Enthalpieänderung  $\Delta H^\circ$  unter anderem ein Maß für die Anzahl der

ausgeprägten Wasserstoffbrückenbindungen dar.

Für jede der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species wurden unabhängig voneinander vier oder fünf Schmelzkurven aufgenommen, der Anteil der entfalteten Moleküle  $f_u$  in Abständen von  $1/2^\circ\text{C}$  berechnet (siehe 2.2.3.7 und 65) und als Funktion  $f_u(T)$  aufgetragen. In Abb.7 sind die gemittelten  $f_u(T)$ -Funktionen für jede tRNS<sup>Lys</sup>-Species dargestellt. Die in Tabelle 6 aufgeführten  $T_m$ -Werte wurden durch Mittelwertbildung der  $T_m$ -Einzelwerte aus vier oder fünf Schmelzkurven, die als  $f_u(T)$  aufgetragen worden waren, gewonnen. Abb.8 zeigt die Van't Hoff-Darstellung der Schmelzdaten der Abb.7; die hieraus berechnete jeweilige Enthalpieänderung  $\Delta H^0$  ist aus Tabelle 6 abzulesen. Die Signifikanz der wiederum geringen Unterschiede der  $T_m$ -Werte wird durch die zugehörigen Standardabweichungen der Mittelwerte belegt. Viel überzeugender aber zeigt der Verlauf der gemittelten  $f_u(T)$ -Funktionen in Abb.7, daß jede tRNS<sup>Lys</sup>-Species ihr individuelles Schmelzverhalten hat. Die beiden in ihrem  $T_m$  unterschiedlichsten Species tRNS<sup>Lys</sup><sub>II</sub> und tRNS<sup>Lys</sup><sub>III</sub> unterscheiden sich in ihrem  $\Delta H^0$ -Wert um  $15 \text{ kcal Mol}^{-1}$ , was nach GRALLA und CROTHERS (90) einen Unterschied von zwei bis drei Basenpaaren ausmachen kann.

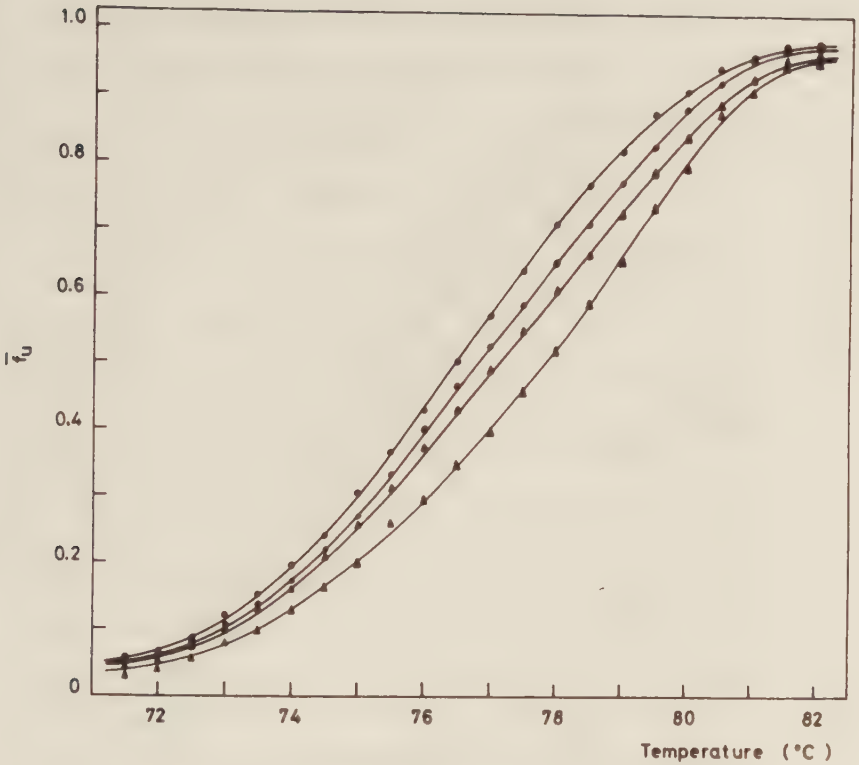


Abb.7 Schmelzkurven der vier  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -Species

( $\bullet-\bullet-\bullet$ )  $\text{tRNA}_I^{\text{Lys}}$ ; ( $\circ-\circ-\circ$ )  $\text{tRNA}_{II}^{\text{Lys}}$ ; ( $\blacktriangle-\blacktriangle-\blacktriangle$ )  $\text{tRNA}_{III}^{\text{Lys}}$ ; ( $\triangle-\triangle-\triangle$ )  $\text{tRNA}_{IV}^{\text{Lys}}$ . Es sind Mittelwerte von  $f_u$  (wie unter 2.2.3.7 definiert) aus vier (Species I) oder fünf (Species II, III, IV) voneinander unabhängigen Experimenten aufgetragen.

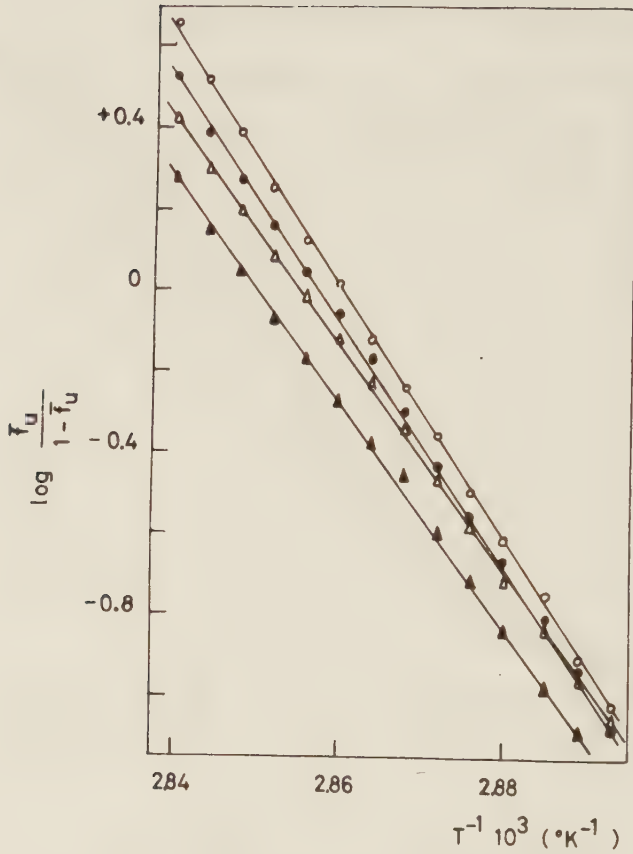


Abb.8 Van't Hoff-Darstellung der Schmelzdaten aus Abb.6  
Die Symbole entsprechen denen der Abb.6.

#### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, aus einem vorwiegend aus Muskulatur bestehendem Gewebe von 13 Tage alten Hühnerembryonen vier lysinspezifische tRNS-Einzelspecies rein darzustellen und vergleichend zu charakterisieren. Die erfolgreiche Darstellung hat sich der Derivatisierung von Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> an der  $\alpha$ -Aminogruppe des Lysins mit dem 2-Naphthoxyacetylester von N-Hydroxy-succinimid bedient, die ihre Abtrennung aus dem tRNS-Gemisch durch BD-Cellulose-Chromatographie möglich gemacht hat. Die Trennung der vier lysinspezifischen Einzel-tRNS voneinander ist durch Reversed-Phase-5-Chromatographie erfolgt. Die bei dieser Prozedur sowie bei der anschließenden biochemischen und physikochemischen Charakterisierung von tRNS<sup>Lys</sup><sub>I</sub>, tRNS<sup>Lys</sup><sub>II</sub>, tRNS<sup>Lys</sup><sub>III</sub> und tRNS<sup>Lys</sup><sub>IV</sub> neu erarbeiteten Erkenntnisse werden zusätzlich durch die am Anfang der Arbeit beschriebenen vergeblichen Versuche ergänzt; es sollte die tRNS<sup>Lys</sup> nach Kopplung der Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> über die  $\alpha$ -Aminogruppe des Lysins an die aktivierte  $\omega$ -Carboxylfunktion von Glutaryl-Merrifield-Harz selektiv abgetrennt werden. Selbstverständlich impliziert auch das Verhalten der tRNS<sup>Lys</sup> bei diesen nicht erfolgreichen Versuchen Aussagen über ihre Tertiärstruktur, die von Belang sind.

Es kann, wie schon mehrfach erwähnt, kaum Zweifel daran

bestehen, daß das Aminosäure-Akzeptorende aller bisher untersuchten tRNS-Arten aus der dreidimensionalen Struktur des Moleküls herausragt. tRNS läßt sich deshalb nach Jodoxidation der cis-Diol-Funktion am 3'-terminalen Adenosin leicht an den hochpolymeren unlöslichen Träger Hydrazinyl-Sepharose binden (91). Die Frage, ob der Aminosäure-Akzeptorarm, insbesondere aber die das 3'-Ende bildende universelle Sequenz -CpCpA, auch nach der Aminoacylierung der tRNS ihre Konformation beibehält oder ob das -CpCpA-Aminoacylende näher an der übrigen kompakteren dreidimensionalen tRNS-Struktur "fixiert" wird, war bisher nicht eindeutig zu klären, da die Labilität der Aminoacyl-Esterbindung einige entsprechende Untersuchungen nicht zuläßt. Die Möglichkeit der chemischen Synthese von Peptidyl-tRNS durch die Reaktion aktivierter Aminosäuren mit der  $\alpha$ -Aminogruppe von Aminoacyl-tRNS (41,51) und auch die Einführung von Derivaten an dieser Gruppe (40,42), wie sie ebenfalls in dieser Arbeit beschrieben wird, können als Argumente gegen eine solche Konformationsänderung aufgefaßt werden. Andererseits ist es bisher nicht gelungen, Aminoacyl-tRNS definitiv über die  $\alpha$ -Aminogruppe an einen hochpolymeren, unlöslichen Träger zu binden. Bei dem Versuch der Kopplung über einen "spacer" (glutamat) an Merrifield-Harz wurde nicht einmal ein geringer Anhalt für eine erfolgte Reaktion erhalten. Bei der gelungenen Derivatisierung der Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>

steigt das Ausmaß der Reaktion mit der Erhöhung der Konzentration an organischem Lösungsmittel. Dies deutet darauf hin, daß die Reaktion durch eine gewisse Auflockerung der dreidimensionalen tRNS-Struktur erleichtert wird. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, daß beladene tRNS dem -CpCpA-Ende komplementäre Oligonucleotide in der Gleichgewichtsdialyse nicht mehr bindet, während die entsprechenden Assoziationskonstanten für unbeladene tRNS hoch sind (O.PONGS, persönliche Mitteilung). Alle diese Ergebnisse können zusammenfassend als Hinweis dafür gewertet werden, daß mit der Aminoacylierung der tRNS eine Konformationsänderung des Aminosäure-Akzeptor-endes einhergeht, die zumindest die angenommene Beweglichkeit des -CpCpA-Endes (S.N. KIM, persönliche Mitteilung) stark einschränkt, so daß zum Beispiel Reaktionen an sterisch ungünstigen hochpolymeren Trägern verhindert werden. Eine solche Konformationsänderung könnte ein zusätzlicher Mechanismus zu Konservierung der Energie der aktivierten Aminosäure oder Ausdruck eines metastabilen Zustandes sein, wie er für biologische Systeme angenommen wird (92,93).

Bei dem in dieser Arbeit angewandten Verfahren zur Reinigung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species sowie ihrer jeweiligen Identifizierung ist die homologe Lysin:tRNS-Ligase(AMP) benutzt worden. Das birgt insofern die Gefahr der Ent-

stehung von Artefakten in sich, als mit der Aktivität von Ribonucleasen in den wenig gereinigten Enzympräparationen zu rechnen ist. Die Kontrolle des Reinigungsverfahrens durch Säulenchromatographie unter identischen Bedingungen, wie sie in Abb.5a-d wiedergegeben ist, zeigt allerdings, daß selbst nach zweimaliger Inkubation mit der die spezifische Ligase enthaltenden Proteinfraktion die vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species sowohl in ihrer Elutionsposition als auch im quantitativen Verhältnis untereinander mit dem als Referenz benutzten Ausgangsmaterial identisch sind. Ein Ergebnis, das zumindest zeigt, daß hier die Aktivität von Ribonucleasen unterhalb der Nachweisbarkeit gelegen hat. Für weitergehende theoretische Überlegungen ist ebenfalls zu berücksichtigen, daß die jeweilige Ausbeute an einer tRNS-Einzelspecies nicht ihre tatsächliche Konzentration in dem untersuchten Gewebe repräsentieren muß, sondern u.a. auch von der Affinität der Ligase zu dieser Species abhängig sein kann.

Die Gesamtausbeute an den vier gereinigten tRNS<sup>Lys</sup>-Species ist niedrig (Abb.4). Von den zu Anfang des umfangreichen Reinigungsverfahrens in der Gesamt-tRNS vorhandenen 980000 pMolen tRNS<sup>Lys</sup> sind schließlich nur 84000 pMole an gereinigten tRNS<sup>Lys</sup>-Einzelspecies gewonnen worden. Derart geringe Ausbeuten werden aber in der Literatur über die Reinigung von tRNS-Species aus höheren Euka-

ryonten auch bei Anwendung wiederholter, kombinierter Chromatographieverfahren berichtet, selbst wenn nur eine von mehreren isoakzeptierenden tRNS-Arten isoliert werden soll (16). Sie sprechen deshalb nicht gegen die angewandte Methode. Aus Abb.4 geht hervor, daß die entsprechende Verluste nicht selektiv sind, sondern alle vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species in gleicher Weise betreffen. Neben den bereits im Ergebnisteil erwähnten Radioaktivitätsverlusten während der Deproteinisierungsschritte - bei Verlust der radioaktiv markierten, tRNS-gebundenen Aminosäure durch Hydrolyse der labilen Aminoacyl-Esterbindung geht hierbei selbstverständlich auch die zugehörige tRNS für die weitere Reinigung verloren - entstehen Verluste auf der BD-Cellulose-Säule. Das Chromatographiematerial sintert durch den Einsatz von Äthanolhaltigen Puffern, der Durchfluß verlangsamt sich entsprechend und so gewinnt bei der lange währenden Elution die sich dauernd ereignende Hydrolyse der 2-Naphthoxyacetyl-lysyl-tRNS-Esterbindung Bedeutung. Die nicht mehr beladene und somit auch nicht derivatisierte tRNS wird schneller eluiert als die durch die Äthanol-Puffer-Lösung desorbierte 2-Naphthoxyacetyl-lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>, so daß, bevor die hochgereinigte derivatisierte Aminoacyl-tRNS<sup>Lys</sup> in genügend hoher Konzentration eluiert wird, dauernd ein Hintergrund an gereingter tRNS<sup>Lys</sup> verloren geht. Die Entwicklung eines Chromatographiemate-

rials mit gleicher Trenncharakteristik aber besseren mechanischen Eigenschaften könnte deshalb die Effektivität der Methode wesentlich vergrößern.

Die Analyse von Gesamt-tRNS aus dem hier benutzten Material durch Fraktionierung auf Reversed-Phase-5-Chromatographie-Säulen gab für die lysinakzeptierenden tRNS-Species eine zweifach höhere Multiplizität, als es der Anzahl der für Lysin bekannten Codons entspräche. Eine derart hohe Multiplizität über die Degeneriertheit des genetischen Codes hinaus wurde nach Einführung des Reversed-Phase-Prinzips und seiner technischen Varianten RPC-1 bis RPC-4 (94,95,96) häufiger berichtet (34,97,98). Aber erst die Entwicklung eines genügend feinkörnigen, inerten Trägermaterials, wie es in den Verfahren RPC-5 und RPC-6 verwendet wird, ließ entsprechend kleine Säulenabmessungen zu, die eine Anwendung für die geringen tRNS-Mengen, die aus höheren Eukaryonten extrahierbar sind, erlaubten. RPC-6 findet aus praktischen Gründen weniger Anwendung (geringe Wasserlöslichkeit des verwendeten Trioctylpropylammoniumbromid läßt nur höchstens 3 Läufe mit einer Säulenfüllung zu). Deshalb kann die Reversed-Phase-5-Chromatographie als das heute am höchsten auflösende Chromatographieverfahren für Nucleinsäuren mittleren Molekulargewichtes angesehen werden. Die hier berichtete Fraktionierung von Gesamt-tRNS

und hochgereinigten tRNS<sup>Lys</sup>-Species durch RPC-5 erforderte die Anwendung extremer Säulenabmessungen (0,6 x 280 cm), um eine zufriedenstellende Trennung von tRNS<sup>Lys</sup><sub>I</sub> und tRNS<sup>Lys</sup><sub>II</sub> zu erreichen. Da das Chromatographiematerial hohe Flüssigkeitsdrucke zuläßt, konnten trotzdem ausreichende Durchflußgeschwindigkeiten erzielt werden. Der Temperaturbereich, in dem optimale Trennleistungen erzielt werden, liegt zwischen 30 und 40 °C (99,100). Das bringt speziell für die chromatographische Analyse isoakzeptierender tRNS den Vorteil mit sich, daß die Entstehung von dimeren tRNS-Molekülen, die bei den normalerweise verwendeten hohen Mg<sup>++</sup>-Konzentrationen möglich ist, vermieden werden kann (101).

Das Auflösungsvermögen der RPC-5 ist so weit entwickelt, daß eine erfolgte Trennung zweier tRNS-Arten sowohl Unterschiede in ihrer Primärstruktur als auch Modifikationsunterschiede im Basen- oder Zuckeranteil gleicher tRNS-Moleküle reflektieren könnte. Eine definitive Aussage darüber, welche dieser beiden Möglichkeiten für die jeweilige tRNS<sup>Lys</sup>-Species zutrifft, könnte bei bekannter Basensequenz gemacht werden

Obwohl durch die aktuelle Entwicklung der Sequenzierungsmethoden (102,103) eine Basensequenzanalyse mit dem wenigen zur Verfügung stehenden Material möglich

wäre, wurde zunächst die hier durchgeführte Charakterisierung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species für vordringlicher erachtet. Aus der Kenntnis von Unterschieden in der Basensequenz allein kann nur schwer auf das Ausmaß ihres Einflusses auf die dreidimensionale Struktur geschlossen werden. Zwei aufgrund einer Punktmutation chromatographisch unterscheidbare tRNS-Species könnten sich in ihren physikochemischen Eigenschaften und in ihrer dreidimensionalen Struktur so wenig unterscheiden, daß sie von ihren Reaktionspartnern in der Zelle nicht als verschieden erkannt werden. Solche Species hätten sich möglicherweise in der Evolution erhalten, da ihr Basensequenzunterschied keine spezifische Funktion hätte; er wäre, zumindest nach der Transkription, keinem Selektionsdruck unterworfen. Es war deshalb das Ziel der charakterisierenden Experimente, herauszufinden, ob die beobachtete Individualität der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Arten sich auf physikochemische und biologische Parameter auswirkt. Nur dann nämlich könnte hinter der tRNS-Multiplizität ein physiologischer Sinn vermutet werden.

Die Versuche zur Codonspezifität haben gezeigt, daß entgegen den Forderungen der CRICK'schen "Wobble"-Hypothese (47) jedes der beiden Lysin-Code-Triplets von jeweils nur zwei bestimmten tRNS<sup>Lys</sup>-Species erkannt werden. Über zwei gereinigte tRNS<sup>Lys</sup>-Species aus Hefe, die ebenfalls

nur einem Codon zugeordnet werden können, ist von GOSH und SEN (104) berichtet worden. Ihre AAA-spezifische Species besitzt in der ersten Position des Anticodon-Triplets ein Thiouracilderivat. Ein ähnliches Thiouracilderivat in der gleichen Position haben CHARABURTTY et al. (105) für  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$  aus E.coli beschrieben. Diese Thiouracilderivate in der entscheidenden Position des Anticodons verhindern anscheinend die Ausbildung eines (G-U)-Basenpaares zwischen Codon und Anticodon und damit die nach der "Wobble"-Hypothese mögliche Erkennung des Lysin-Codons AAG. In Arbeiten von RUDLOFF und HILSE (48) über die molekularbiologische Bedeutung dieses selektiven Erkennungsmechanismus, die mit den  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -enthaltenden Fraktionen einer Gesamt-tRNA aus Reticulozyten durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, daß eine Species mit AAG-Spezifität Lysin für den Einbau in die  $\alpha$ -Kette des Hämoglobins bereitstellt, während eine AAA-spezifische für die Aktivierung und Adaptation des Lysins der  $\beta$ -Kette benutzt wird. Insgesamt wurden dabei ebenfalls vier lysinakzeptierende Species demonstriert, die beschriebenen Untersuchungen jedoch waren nur mit den beiden Hauptspecies durchführbar. Unter definierteren Bedingungen wurden diese Ergebnisse von WOODWARD und HERBERT (49) dahingehend korrigiert, daß in beiden Ketten für jeweils 10 Lysinpositionen die AAG-spezifische  $\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ -Species und für 2 Positionen

die AAA-spezifische benötigt wird.

Es sind jedoch nicht nur Versuche über die Anpassung der lysinspezifischen tRNS an die Degeneriertheit des genetischen Code, die den experimentellen Aufwand, der mit der Reinigung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Einzelspecies verbunden war, letztlich rechtfertigen, sondern die Frage nach der Bedeutung der Existenz von jeweils zwei Species, die das gleiche Codon erkennen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß selbst die beiden von ihrer Elutionsposition in der RPC-5 her als nahe verwandt einzustufenden Species tRNS<sup>Lys</sup><sub>I</sub> und tRNS<sup>Lys</sup><sub>II</sub> sich der G-spezifischen Ribonuclease gegenüber verschieden verhalten (Abb.6). Ihre Molekulargewichte zeigen die größte Differenz (Tabelle 6). Ihre T<sub>m</sub>-Werte wiederum liegen sehr nahe beieinander. Führt man eine solche Vergleichsanalyse der im Ergebnisteil dargestellten Daten für alle vier tRNS<sup>Lys</sup>-Arten durch, dann läßt jede der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Einzelspecies trotz bestehender Ähnlichkeiten mit anderen Species charakteristische Eigenschaften erkennen.

Warum jeweils zwei individuelle tRNS<sup>Lys</sup>-Species dazu benötigt werden, letztlich dann doch die gleiche Aminosäure für die Translation des gleichen Lysin-Codons zur Verfügung zu stellen, kann zunächst nur spekulativ

diskutiert werden. Grundsätzlich könnte die beobachtete Multiplizität für beide Phasen des Translationsgeschehens von Bedeutung sein. Im Bereich der die Aminosäure aktivierenden und adaptierenden Reaktionen könnte sie sich im Zusammenhang mit der Beobachtung als relevant erweisen, daß im Ausgangsgewebe mehrere Lysin:tRNS-Ligasen(AMP) an der Aminoacylierung beteiligt sind (S.REUTER, H.GOTTSCHLING, persönliche Mitteilung). Zum anderen gibt es in letzter Zeit in der Literatur wiederholt Hinweise darauf, daß die mRNS innerhalb des Polysomenverbandes eine konkrete dreidimensionale Struktur einnehmen muß. Jeweils spezialisierte Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup>-Species könnten für Lysin-Codons in unterschiedlichen sterischen Situationen benötigt werden. Einen besonderen Aspekt eröffnen hierbei auch die theoretischen Untersuchungen von KURLAND et al. (106), der feststellt, daß, die Codon-Anticodon-Wechselwirkung allein für die Zuverlässigkeit der tRNS-Auswahl nicht hinreichend ist, daß vielmehr spezifische Strukturerkennungsmechanismen am Ribosom postuliert werden müssen, für deren Bahnung die Konformation des Anticodonarms des jeweiligen tRNS-Moleküls verantwortlich ist. Die Reindarstellung der vier tRNS<sup>Lys</sup>-Species stellt eine Voraussetzung dar für Experimente, die solche Fragen entscheiden könnten.

## 5. Zusammenfassung

Es wurden Versuche zur Isolierung und Reinigung der vier lysinspezifischen tRNS-Einzelspecies, die in Gesamt-tRNS-Präparationen aus Rumpfen von 13 Tage alten Hühnerembryonen identifiziert worden waren, durchgeführt. Das zuerst angewandte Verfahren, bei dem Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> über die  $\alpha$ -Aminogruppe des Lysins an die aktivierte  $\omega$ -Carboxylfunktion von an Merrifield-Harz gebundenem Glutamat gekoppelt werden sollte, um nach Abtrennung der nicht gebundenen tRNS und anschließender Abspaltung der tRNS<sup>Lys</sup> die gereinigten lysinspezifischen tRNS-Arten zu erhalten, war nicht erfolgreich. Daraus abgeleitete Vorstellungen über die Konformation des Aminosäure-Akzeptorendes von Aminoacyl-tRNS werden diskutiert. Die Isolierung eines gereinigten Gemisches der lysinspezifischen tRNS-Species gelang durch eine unter speziellen Bedingungen durchgeführte Derivatisierung an der  $\alpha$ -Aminogruppe von Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> mit dem 2-Naphthoxyacetylesther von N-Hydroxysuccinimid und Abtrennung der derivatisierten Lysyl-tRNS<sup>Lys</sup> von aller anderen tRNS durch Chromatographie an BD-Cellulose. Durch daran anschließende Chromatographie an einem Reversed-Phase-5- Säulensystem konnte das Gemisch der tRNS<sup>Lys</sup>-Species aufgetrennt werden; damit wurden hochgereinigte Präparate der Einzelspecies tRNS<sup>Lys</sup><sub>I</sub>, tRNS<sup>Lys</sup><sub>II</sub>, tRNS<sup>Lys</sup><sub>III</sub> und tRNS<sup>Lys</sup><sub>IV</sub> gewonnen. Diese Präparate wurden durch fol-

gende biochemische und physikochemische Verfahren charakterisiert:

1. Partielle Spaltung mit Ribonuclease- $T_1$  und Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Spaltprodukte. Es werden Unterschiede im Verteilungsmuster sowohl der partiell gespaltenen großen als auch der vollständig gespaltenen kleinen Oligonucleotide zwischen allen vier  $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ -Species nachgewiesen.
2. Identifizierung der Codon-Spezifität durch
  - a) Bestimmung der Assoziationskonstanten für die komplementäre Bindung der Tetranucleosidtriphosphate ApApGpA und ApApApA im Anticodon-Abschnitt der jeweiligen  $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ -Species durch Gleichgewichtsdialyse. ApApGpA wird ausschließlich von  $\text{tRNS}_{\text{I}}^{\text{Lys}}$  und  $\text{tRNS}_{\text{II}}^{\text{Lys}}$  gebunden, ApApApA von  $\text{tRNS}_{\text{III}}^{\text{Lys}}$  und  $\text{tRNS}_{\text{IV}}^{\text{Lys}}$ .
  - b) Polylysinsynthese in einem von Poly(A) gesteuerten ribosomalen System in Abhängigkeit von jeweils einer Lysyl- $\text{tRNS}^{\text{Lys}}$ -Species. Polylysinsynthese ist nur mit Lysyl- $\text{tRNS}_{\text{III}}^{\text{Lys}}$  und Lysyl- $\text{tRNS}_{\text{IV}}^{\text{Lys}}$  nachzuweisen.
3. Bestimmung der Halbwertszeiten der Aminoacyl- $\text{tRNS}$ -Esterbindungen unter den Bedingungen einer schnellen nucleophilen Katalyse.
4. Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten durch Hochgeschwindigkeitssedimentation in der Analytischen Ultrazentrifuge und Berechnung der Molekular-

gewichte.

5. Analyse des Konformationsüberganges von dem durch Wasserstoffbrückenbindungen gefalteten in den entfalteten Zustand durch Aufzeichnung der Extinktionsänderung in Abhängigkeit von der Temperatur. Bestimmung des Mittelpunktes des Extinktionsüberganges  $T_m$  und Berechnung der Enthalpieänderung  $\Delta H^\circ$ .

Die Ergebnisse dieser Versuche charakterisieren jede der vier  $\text{trNS}^{\text{Lys}}$ -Arten als selbständige Species mit ausgeprägten individuellen Eigenschaften.

## 6. Literaturverzeichnis

1. F.H.C. Crick,  
"A Note for the RNA Tie Club" 1955. Wiedergegeben  
von M.B. Hoagland,  
in "The Nucleic Acids", Vol.III (1960) S.400,401,  
Academic Press New York und London.
2. F.H.C. Crick,  
Nature, 227 (1970) 561.
3. M. Eigen,  
Naturwissenschaften, 58 (1971) 465.
4. O. Pongs, K.H. Nierhaus, V.A. Erdmann und H.G.Wittmann,  
FEBS-Letters, 40 (Supplement) (1974) 28.
5. S. Altmann,  
Cell, 4 (1975) 21.
6. B.G. Barrel und B.F. Clark,  
"Nucleic Acid Sequences", (1974), Joynson-Bruvvers,  
Oxford.
7. S.H. Kim, G.J. Quigley, F.L. Suddath, A. McPherson,  
D. Sneden, J.J. Kim, J. Weinzierl und A. Rich,  
Science (Wash.D.C.), 179 (1973) 285.
8. J.D. Robertus, J.E. Ladner, J.T. Finch, D. Rhodes,  
R.S. Brown, B.F.C. Clark und A. Klug,  
Nature, 250 (1974) 546.
9. H.G. Zachau,  
in "Transfer Ribonucleic Acids in the Mechanism of  
Protein Synthesis and its Regulation", (1972),  
North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
10. F. Cramer,  
in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular  
Biology", Vol.11 (1971) S.391, Academic Press,  
New York und London.

11. R.W. Chambers,  
in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular  
Biology", Vol.11 (1971) S.489, Academic Press,  
New York und London.
12. S. Nishimura,  
in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular  
Biology, Vol.12 (1972) S.49, Academic Press,  
New York und London.
13. D.M. Crothers, T. Seno und D.G. Söll,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 (1972) 3063.
14. P.M. Bhargava, T. Pallaiah und E. Premkumar,  
J. theor. Biol., 29 (1970) 447.
15. W.K. Yang und G.D. Novelli,  
in "Methods in Enzymology", Vol.XX Part C (1971) S.44,  
Academic Press, New York, London.
16. R.L. Pearson, C.W. Hancher, J.F. Weiss, D.W. Holladay  
und A.D. Kelmers,  
Biochim. Biophys. Acta, 294 (1973) 236.
17. E. Rudloff und K. Hilse,  
Eur. J. Biochem., 24 (1971) 313.
18. B.J. Ortwerth und L.P. Liu,  
Biochemistry, 12 (1973) 3978.
19. N.H. Scherberg und S.B. Weiss,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 (1972) 1114.
20. A. Yndeleovich,  
J. Mol. Biol., 60 (1971) 21.
21. C.E. Singer, G.R. Smith, R. Cortese und B.N. Ames,  
Nature New Biol., 238 (1972) 72.
22. M. Brenner und B.N. Ames,  
in "Metabolic Pathways", 3.Ed. Vol.V, S.380.

23. K.B. Jakobson,  
Nature new Biol., 231 (1971) 18.
24. T. Sekiya und O. Kin-Ichiro,  
Virology, 47 (1972) 168.
25. P.H. Mäenpää und M.R. Bernfield,  
Biochemistry, 8 (1969) 4926.
26. J.-P. Garel,  
J. theor. Biol., 43 (1974) 225.
27. K.W. Lanks und I.B. Weinstein,  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 40 (1970) 708.
28. L.C. Waters, B.C. Mullin, Ti Ho und W.K. Yang,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72 (1975) 2155.
29. P.W. Holley, I. Apgar, G.A. Everett, J.T. Madison,  
S.H. Merrill, J.R. Penswick und A. Zamir,  
Science, 147 (1965) 1462.
30. H.G. Zachau, D. Dütting und H. Feldmann,  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 347 (1966) 212.
31. J.T. Madison, G.A. Everett und H. Kung,  
Science, 153 (1966) 531.
32. I.C. Gillam und G.M. Tener,  
in "Methods in Enzymology", Vol.XX Part C (1971),  
S.55, Academic Press, New York, London.
33. S.A. Fairfield und W.E. Barnett,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68 (1971) 2972.
34. B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling,  
Eur. J. Biochem., 49 (1974) 521.
35. U.L. RajBhandary, R.D. Faulkner und A. Stewart,  
J. Biol. Chem., 243 (1968) 575.
36. D. Yoshikami, G. Katz, E.B. Keller und B.S. Dudock,  
Biochim. Biophys. Acta, 166 (1968) 714.

37. L.M. Fink, T. Goto, F. Frankel und I.B. Weinstein,  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 32 (1968) 963.
38. T.P. Zimmerman, B. Robison und J.H. Gibbs,  
Biochim. Biophys. Acta, 209 (1970) 151.
39. I.H. Maxwell, E. Wimmer und G.M. Tener,  
Biochemistry, 10 (1968) 2629.
40. U.Z. Littauer,  
in "Methods in Enzymology", Vol.XX Part C (1971),  
S.70, Academic Press, New York, London.
41. Y. Lapidot, D. Elat, S. Rappoport und N. de Groot,  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 38 (1970) 559.
42. I. Gillam, D. Blew, R.C. Warrington, M. v.Tigerstrom  
und G.M. Tener,  
Biochemistry, 7 (1968) 3459.
43. S.M. Heywood und A. Rich,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 59 (1968) 590.
44. S. Nishimura und I.B. Weinstein,  
Biochemistry, 8 (1969) 832.
45. R.C. Gallo und S. Pestka,  
J. Mol. Biol., 52 (1970) 195.
46. L.P. Liu und B.J. Ortwerth,  
Biochemistry, 11 (1972) 12.
47. F.H.C. Crick,  
J. Mol. Biol., 19 (1966) 548.
48. E. Rudloff und K. Hilse,  
Eur. J. Biochem., 24 (1971) 113.
49. W.R. Woodward und E. Herbert,  
Science, 177 (1972) 1197.
50. B.J. Ortwerth und L.P. Liu,  
Biochemistry, 12 (1973) 3978.

51. Y. Lapidot, N. de Groot, S. Rappoport und D. Elat,  
Biochim. Biophys. Acta, 190 (1969) 304.
52. D. Waldi,  
in "Dünnschichtchromatographie" von E. Stahl, (1962)  
S.501, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
53. R.B. Merrifield,  
J. Chem. Soc., 85 (1963) 2149.
54. S. Moore und W.H. Stein,  
J. Biol. Chem., 211 (1954) 907.
55. M.J. Stewart und J.D. Young,  
in "Solid Phase Peptide Synthesis", (1969) S.5, 55  
und 67, W.H. Freeman and Company, San Francisci.
56. B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling,  
Biochim. Biophys. Acta, 331 (1973) 221.
57. P.S. Sarin und P.C. Zamecnik,  
Biochim. Biophys. Acta, 91 (1964) 653.
58. F.J. Bollum,  
J. Biol. Chem., 234 (1959) 2733.
59. G.W. Anderson, J.E. Zimmerman und F.M. Callahan,  
J. Am Chem. Soc., 86 (1964) 1839.
60. I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. von Tigerstrom,  
E. Wimmer und G.M. Tener,  
Biochemistry, 6 (1967) 3043.
61. H.R. Reeves, N. Imura, H. schwam, G.B. Weiss,  
H. Shulman und R.W. Chambers,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60 (1968) 1450.
62. R.C. Pearson, J.F. Weiss und A.D. Kelmers,  
Biochim. Biophys. Acta, 228 (1971) 770.
63. G.G. Brownlee,  
in "Determination of Sequences in RNA", (1972) S.23,  
24, 27 und 28, North-Holland/American Elsevier.

64. E.G. Richard, J.A. Coll und W.B. Gratzner,  
Anal. Biochem., 12 (1963) 452.
65. S. Reuter,  
Dissertation, (1976), Freie Universität Berlin.
66. O.Pongs, R. Bald und E. Reinwald,  
Eur. J. Biochem., 32 (1973) 117.
67. O.L. Uhlenbeck, J. Baller und P. Doty,  
Nature, 225 (1970) 508.
68. G.A. Bray,  
Anal. Biochem., 1 (1960) 279.
69. J.H. Cronenberger und V.A. Erdmann,  
J. Mol. Biol., 95 (1975) 125.
70. H. Gottschling und H.G. Zachau,  
Biochim. Biophys. Acta, 103 (1965) 418.
71. B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling,  
Eur. J. Biochem., 49 (1974) 521.
72. C. Tanford,  
in "Physical Chemistry of Macromolecules", (1961)  
S.367, J. Wiley and Sons, Inc., New York, London.
73. C.H. Chervenka,  
in "A Manual of Methods for the analytical ultracentrifuge", (1970), published by Spinco Division of  
Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California.
74. T. Svedberg und K.O. Pedersen,  
in "The Ultracentrifuge", (1940), Oxford, Clarendon  
Press, Johnson Reprint Corporation, New York.
75. A. Adams, T. Lindahl und J.R. Fresco,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57 (1967) 1684.
76. M. Bodansky und J.T. Sheehan,  
Chem. Ind. London, (1966) S.1597.

77. R.L. Letsinger, M.J. Kornet, V. Mahedevan und  
D.M. Jerina,  
J. Am. Chem. Soc., 86 (1964) 5163.
78. H.D. Jakubke und H. Jeschkeit,  
in "Aminosäuren, Peptide, Proteine", (1973), S.124,  
125, Akademie-Verlag, Berlin.
79. K. Lübke, E. Schröder und G. Kloss,  
in "Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und  
Proteine", Band 1 (1975), Thieme-Verlag, Stuttgart.
80. Y. Lapidot, N. de Groot, M. Weiss, R. Peled und  
Y. Wolman,  
Biochim. Biophys. Acta, 138 (1967) 241.
81. F. Egami und K. Nakamura,  
in "Microbial Ribonucleases" (1969) S.31, Springer-  
Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
82. F. Sanger, G.G. Brownlee und B.G. Barrell,  
J. Mol. Biol., 13 (1965) 373.
83. K. Harbers, R. Thiebe und H.G. Zachau,  
Eur. J. Biochem., 26 (1972) 132.
84. O. Pongs und K. Griesse,  
FEBS-Letters, 26 (1972) 297.
85. J.D. Robertus, J.E. Ladner, J.T. Finch, D. Rhodes,  
R.S. Brown, B.F.C. Clark und A. Klug,  
Nucleic Acids Research, 1 (1974) 927.
86. G. Chinali, M. Sprinzl, A. Parmeggiani und F. Cramer,  
Biochemistry, 13 (1974) 3001.
87. C.H. Yang und D. Söll,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71 (1974) 2838.
88. D. Hentzen, P. Mandel und J.P. Garel,  
Biochim. Biophys. Acta, 281 (1972) 228.

89. H.A. Scheraga und L. Mandelkern,  
J. Am. Chem. Soc., 75 (1953) 179.
90. J. Gralla und D.M. Crothers,  
J. Mol. Biol., 78 (1973) 301.
91. P. Remy, C. Birmelé und J.P. Ebel,  
FEBS-Letters, 27 (1972) 134.
92. E. Neumann,  
Angew. Chem., 10 (1973) 430.
93. A. Revzin, E. Neumann und A. Katchalsky,  
J. Mol. Biol., 79 (1973) 95.
94. A.D. Kelmers, G.D. Novelli und M.P. Stulberg,  
J. Biol. Chem., 240 (1965) 3979.
95. J.F. Weiss und A.D. Kelmers,  
Biochemistry, 6 (1967) 2507.
96. J.F. Weiss, R.C. Pearson und A.D. Kelmers,  
Biochemistry, 7 (1968) 3479.
97. R.C. Pearson, C.W. Hancher, J.F. Weiss, D.W. Holladay  
und A.D. Kelmers,  
Biochim. Biophys. Acta, 294 (1973) 236.
98. M.W. Taylor,  
Cancer Res. 30 (1970) 2463.
99. Z.B. Egan,  
Biochim. Biophys. Acta, 299 (1973) 245.
100. A.D. Kelmers und D.E. Heatherly,  
Anal. Biochem., 44 (1971) 486.
101. H.G. Zachau,  
Eur. J. Biochem., 5(1968) 559.
102. M. Simsek, J. Ziegenmeyer, J. Heckmann und  
U.L. RajBhandary,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 (1973) 1041.

103. K.S. Szeto und D. Söll,  
Nucleic Acids Research, 1 (1974) 171.
104. H.P. Gosh und G.C. Sen,  
Biochim. Biophys. Acta, 308 (1973) 106.
105. K. Chakraburttty, A. Steinschneider, R.V. Case und  
A.H. Mehler,  
Nucleic Acids Research, 2 (1975) 2069.
106. C.G. Kurland, R. Rigler, M. Ehrenberg und C. Blomberg,  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72 (1975) 4248.



In dieser Arbeit wurden einige Abbildungen der Publikation: B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling, Biochem. Biophys. Acta, 331 (1973) 221, mit der Erlaubnis des Verlages reproduziert.



## Lebenslauf

### I. Persönliches

#### 1. Name, Geburtsdatum, Geschwister

Burghardt Wittig, geboren am 3.12.1947 in Celle.

Eine ältere Schwester.

#### 2. Eltern

Hildegard Wittig, geb. Oelker und Hörgeräteakustiker

Martin Wittig.

### II. Schule

1954-58 Grundschule Wienhausen und Nienhagen im Kreis

Celle. 1958-66 Gymnasium Ernestinum Celle, Altsprachl.

Humanistisches Gymnasium. Abitur 22.9.1966.

### III. Wehrdienst

1.10.1966-10.10.1968 bei einer Kampfpanzereinheit,

OLt. d. Res.

### IV. Ausbildung

1.1.1970-1.1.1972, während des Medizinstudiums, Aus-

bildung zum Hörgeräteakustiker im elterlichen Betrieb.

28.7.1972 Gesellenprüfung.

### V. Studium

15.11.1968 Immatrikulation zum Studium der Humanmedizin  
an der Freien Universität Berlin.

14.8.1975 medizinisches Staatsexamen an der FU Berlin.

Seit 1970 am Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
der Freien Universität Berlin Promotionsarbeit in der Ar-  
beitsgruppe Ass.-Prof. Dr. H. Gottschling.

Seit 1.10.1975 Wissenschaftlicher Assistent im Institut für  
Molekularbiologie und Biochemie an der FU Berlin.









